

PAULO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS *NATURAL KILLERS* (NK) EM
SANGUE DE CIRCULAÇÃO PERIFÉRICA E FLUIDO DE
LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES PORTADORES
DE SEPSE PULMONAR: ESTUDO DE CASOS-CONTROLE**

CURITIBA

2017

PAULO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS *NATURAL KILLERS* (NK) EM
SANGUE DE CIRCULAÇÃO PERIFÉRICA E FLUIDO DE
LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES PORTADORES
DE SEPSE PULMONAR: ESTUDO DE CASOS-CONTROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, linha de pesquisa: Fisiologia Endócrina e Metabólica, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Profa. Dra. Anita Nishiyama.

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Guimarães, Paulo de Souza Fonseca

Avaliação de células *Natural Killers (NK)* em sangue de circulação periférica e fluido de lavado broncoalveolar de pacientes portadores de sepse pulmonar: estudo de casos-controle. / Paulo de Souza Fonseca Guimarães. – Curitiba, 2017.

135 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Anita Nishiyama

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Sepse 2. Celulas killer 3. Citocinas I. Título II. Nishiyama, Anita III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 574.1

Ata da Defesa de Tese de Doutorado de PAULO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES

Aos vinte e nove dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezessete, foi realizada na sala 421 do Departamento de Botânica no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de tese do doutorando **PAULO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES**, intitulada **“AVALIAÇÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLERS (NK) EM SANGUE DE CIRCULAÇÃO PERIFÉRICA E FLUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES PORTADORES DE SEPSE PULMONAR: ESTUDO DE CASOS-CONTROLE”**. A abertura teve início às 14h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora do candidato, Professora Doutora Anita Nishiyama. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua tese. Após a explanação oral, a Professora Doutora Anita Nishiyama passou a palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Juliano Mendes de Souza do departamento de Ciências da Saúde da FPP. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Luiz Carlos Von Bahten do Hospital Universitário Cajuru da PUC-PR. Em seguida Passou a palavra ao terceiro examinador, Professora Doutora Juliana Bello Baron Mauer do departamento de Bioquímica da UFPR e por último passou a palavra ao quarto examinador Professor Doutor Luiz Cláudio Fernandez do Departamento de Fisiologia da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Anita Nishiyama fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “Aprovação”, habilitando-o ao título de Doutor em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professora Doutora Fabíola Iagher, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 29 de agosto de dois mil e dezessete.



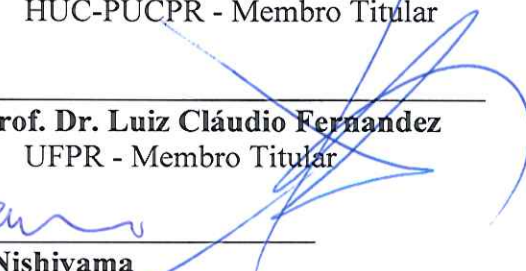
Prof. Dr. Juliano Mendes de Souza
FPP - Membro Titular



Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten
HUC-PUCPR - Membro Titular



Profa. Dra. Juliana Bello Baron Mauer
UFPR - Membro Titular



Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandez
UFPR - Membro Titular



Profa. Dra. Anita Nishiyama
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **PAULO DE SOUZA FONSECA GUIMARÃES** para fins de obter o título de Doutor em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à Aprovação do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Juliano Mendes de Souza
FPP - Membro Titular

Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten
HUC-PUCPR - Membro Titular

Profa. Dra. Juliana Bello Baron Mauer
UFPR - Membro Titular

Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandez
UFPR - Membro Titular

Profa. Dra. Anita Nishiyama
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

A minha amada esposa Fernanda e aos meus amados filhos Isadora e
Matheus.

Aos meus pais, Archimedes e Romilda.

Aos meus irmãos, Marcos, Sandra, Elaine e Fernando.

Enfim, a tudo o que realmente importa e aos amigos.

Agradeço à Deus sobre todas as coisas e ao maior presente que podemos ter:
a vida!

AGRADECIMENTOS

À PROFA. DRA. ANITA NISHIYAMA (Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da UFPR), orientadora deste trabalho, pelo esforço, apoio e dedicação na realização deste estudo.

Ao DR. FERNANDO DE SOUZA F. GUIMARÃES (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research and Department of Medical Biology University of Melbourne), não melhor cientista do que irmão e grande incentivador do projeto, pelas incansáveis horas dispendidas no auxílio da realização deste estudo.

À PROFA. DRA. ALEXANDRA CRISTINA SENEGAGLIA e DRA. LIDIANE MARIA BOLDRINI LEITE (Núcleo de Tecnologia Celular da PUC-PR), pelo grande, incansável e incondicional apoio técnico na realização do trabalho.

Ao DR. FERNANDO GUIMARÃES (Hospital da Mulher “Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” – CAISM – UNICAMP) pelo apoio técnico na realização do trabalho.

Aos colaboradores das Unidades de Terapia Intensiva e do Serviço de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru que, com muita paciência, auxiliaram na coleta das amostras deste trabalho.

A todos os meus amigos e familiares, que direta ou indiretamente, tiveram participação na realização deste trabalho.

Pergunta tão rica, precisava andar por aí mendigando respostas?

Paulo Leminski

RESUMO

A sepse é uma disfunção orgânica aguda complexa potencialmente fatal consequente de uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica desencadeada por um quadro infeccioso. Os mecanismos subjacentes à fisiopatologia da sepse que envolve processos dinâmicos pró e anti-inflamatórios ainda permanecem mal compreendidos. As células do *Natural Killers* (NK) desempenham papel crucial na fisiopatologia da sepse, com íntima relação aos processos de inflamação exagerada decorrentes de sua resposta rápida e da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon gama (IFN- γ). Vários estudos já mostraram que as células NK tem seus níveis reduzidos no plasma de sangue periférico de pacientes portadores de sepse. No entanto, nossa atual compreensão dos mecanismos por trás do seu tráfego celular, assim como, no seu papel no desenvolvimento da doença está restrita aos estudos em modelos animais de sepse. Neste estudo, buscamos comparar os níveis do subconjunto de células NK humanas (CD56^{bright} e CD56^{dim}) no plasma de sangue periférico e fluido de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes portadores de sepse pulmonar. Realizou-se um estudo caso-controle constituído por 10 pacientes saudáveis (controle) e 23 pacientes portadores de sepse pulmonar internados em Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Cajuru da Pontifícia Universidade Católica do Paraná no período de 2013 a 2015. Embora pudéssemos confirmar observações anteriormente descritas de linfopenia do plasma de sangue periférico, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de células NK no LBA desses pacientes. Em geral, esses achados reforçam a evidência de que a redução dos níveis de células NK no plasma de sangue periférico pode estar associada à mecanismos de morte celular e apoptose consequentes da sepse.

Palavras-chave: Células *Natural Killers*; sepse pulmonar; linfopenia; interleucinas; citocinas pró-inflamatórias; CD4; CD8; lavado broncoalveolar.

ABSTRACT

Sepsis is a complex systemic inflammatory syndrome, the most common cause of which is attributed to systemic underlying bacterial infection. The complete mechanisms of the dynamic pro- and anti-inflammatory processes underlying the pathophysiology of sepsis remain poorly understood. Natural killer (NK) cells play a crucial role in the pathophysiology of sepsis, leading to exaggerated inflammation due their rapid response and production of pro-inflammatory cytokines such as interferon gamma (IFN- γ). Several studies have already shown that NK cells undergo lymphopenia in the peripheral blood of patients with sepsis. However, our understanding of the mechanisms behind its cellular trafficking and its role in disease development is restricted to studies in animal models. In this study, we aimed to compare the human NK cell subset (CD56bright or dim) levels in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of sepsis patients. We conducted a case-control study with a sample size consisting of 10 control patients and 23 sepsis patients enrolled at the Hospital Cajuru (Curitiba/PR, Brazil) from 2013 to 2015. Although we were able to confirm previous observations of peripheral blood lymphopenia, no significant differences were detected in NK cell levels in the BAL fluid of these patients. Overall, these findings strengthened the evidence that peripheral blood lymphopenia is likely to be associated with cell death as a consequence of sepsis.

Keywords: natural killer cells; lung sepsis; lymphopenia; bronchoalveolar lavage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Resposta inflamatória em cascata.....	06
Figura 2. Dinâmica das mudanças na resposta SIRS e CARS	07
Figura 3. Ativação de células NK	18
Figura 4. Materiais para realização de broncoscopia	31
Figura 5. Fibrobroncoscópio	32
Figura 6. Fonte de luz halógena	33
Figura 7. Aparelho de Citometria de Fluxo	33
Figura 8. Posicionamento do endoscopista.	35
Figura 9. Frasco de coleta de secreção brônquica	35
Figura 10. Marcação de antígenos intracelulares e de superfície por Citometria de Fluxo	37
Figura 11. Concentrações de interleucina 6 (IL-6) do plasma e LBA a de pacientes com sepse	49
Figura 12. Concentrações de interleucina 2 e 4 (IL-2 e IL-4) do plasma e LBA de pacientes com sepse.....	49
Figura 13. Concentrações de interferon gama (IFN- γ) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) em pacientes com sepse	50
Figura 14. Representação dos subconjuntos de células NK CD3 ^{neg} , CD56 ^{bright} e CD56 ^{dim} por citometria de fluxo	51
Figura 15. Subconjunto de células <i>Natural killer</i> (NK)	52
Figura 16. Subconjunto de células <i>Natural Killer</i> (NK) CD 56 ^{dim} obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse	53

Figura 17. Representação dos subconjuntos de células NK CD4 ⁺ e CD8 ⁺ por citometria de fluxo	54
Figura 18. Subconjunto de células T CD4 ⁺ , obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse	55
Figura 19. Subconjunto de células T CD8 ⁺ , obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse	56

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1. Critérios de diagnóstico para sepse	4
Tabela 2. Sepse severa	5
Quadro 1. Conjunto de Anticorpos Utilizados	39
Tabela 3. Parâmetros clínicos dos pacientes portadores de sepse pulmonar e casos controle	42
Tabela 4. Resultado de culturas solicitadas a partir do lavado broncoalveolar (LBA)	43
Tabela 5. Perfil clínico e laboratorial dos pacientes portadores de sepse	44

LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico 1. Relação da concentração plasmática de Vitamina D [25(OH)D]	47
Gráfico 2. Relação da concentração plasmática de albumina	47
Gráfico 3. Relação da concentração plasmática de Proteína C Reativa (PCR)	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SIRS	Síndrome de resposta inflamatória Sistêmica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
MRSA	<i>Methicillin resistente Staphylococcus aureus</i>
FMOS	Falência de Múltiplos Órgãos e Sistemas
PCR	Proteína C Reativa
TLR	<i>Toll like receptors</i>
ROS	Reactive oxygen species
PCT	Pró-calcitonina
NO	<i>Nitric oxide</i>
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i>
APACHE II	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
MEDS	<i>Mortality in Emergency Department Sepsis</i>
TNF- α	Fator alfa de necrose tumoral
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IFN- γ	Interferon gama
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PAMPs	<i>Microbial associated molecular patterns</i>
DAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>

LPS	Lipopolissacarídeo
NF- κ B	Fator nuclear capa beta
NK	<i>Natural Killer</i>
Th	Células T <i>helper</i>
T _{reg}	Células T reguladoras
LBA	Lavado broncoalveolar
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Definição de sepse	01
1.1. Epidemiologia	01
1.2. Critérios diagnósticos	02
1.3. Fisiopatologia	08
1.4.1 Resposta <i>normal</i> à infecção	08
1.4.2 Resposta exacerbada à infecção observada na sepse	09
1.4.3 Resposta endotelial	11
1.4.4 Ativação de citocinas	12
1.4.5 Papel das células NK	16
1.4.6 Fatores clínicos que interferem na resposta do hospedeiro à sepse	19
1.5 Tratamento da sepse	22
1.5.1. Terapia antimicrobiana	22
1.5.2. Reposição hidroeletrólítica	23
1.5.3. Vasopressores e agentes inotrópicos	24
1.5.4. Corticosteroides	25
1.5.5. Estudos e desafios no tratamento da sepse	26
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29

4. MÉTODOS	30
4.1. Descrição das amostras	30
4.1.1. Critérios de inclusão	30
4.1.2. Critérios de exclusão	31
4.2. Materiais	31
4.2.1. Materiais hospitalares descartáveis	31
4.2.2. Reagentes	32
4.2.3. Equipamentos de broncoscopia	32
4.2.4. Equipamentos de citometria	33
4.3. Descrição dos procedimentos	34
4.3.1. Lavado broncoalveolar	34
4.3.2. Isolamento das células do lavado broncoalveolar e do sangue periférico	36
4.3.3. Caracterização celular por citometria de fluxo	37
4.3.4. Determinação de citocinas por citometria de fluxo	39
4.3.5. Análise estatística	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Epidemiologia da amostra:	41
5.2. Concentrações das citocinas pró-inflamatórias em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse	48
5.3. Subconjuntos das células NK (CD3⁻, CD56^{bright} e CD56^{dim}) em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse	50
5.4. Concentração das células T CD4⁺ e T CD8⁺ em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse	53

6. DISCUSSÃO	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
8. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67
NORMAS ADOTADAS	76
BASES DE DADOS CONSULTADAS	77
ANEXO 1 - BRONCOSCOPIA E LAVADO BRONCOALVEOLAR	78
ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	89
ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	96
ANEXO 4 - PROTOCOLO DE TRATAMENTO DA SEPSE	102
ANEXO 5 - PROTOCOLO CITOMETRIA DE FLUXO	104
ANEXO 6 - ARTIGO PUBLICADO	107
ANEXO 7 - ARTIGO A SER SUBMETIDO	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de sepse:

A sepse é uma disfunção orgânica aguda potencialmente fatal causada pela resposta inflamatória sistêmica e exacerbada do hospedeiro à infecção [1,2]. É consequente de uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) desencadeada por um quadro infeccioso [3]. A sepse é severa quando ocorre alguma disfunção orgânica como insuficiência renal, hepática, pulmonar ou intestinal, associada a hipoperfusão e/ou hipotensão e, se não prontamente revertida, pode agravar-se e evoluir para o choque séptico, quando a hipotensão é refratária à reposição hidroeletrólítica e ao uso de certas drogas vasoativas, levando à falência de múltiplos órgãos e sistemas (FMOS) com elevadas taxas de mortalidade [4]. Os órgãos mais afetados na sepse e no choque séptico são os pulmões, o sistema cardiovascular e os rins [5]. A sepse não é uma doença específica, mas sim uma síndrome que abrange uma patogenicidade ainda incerta que pode ser identificada por diferentes sinais e sintomas clínicos, sem um teste diagnóstico “padrão ouro” [3].

1.2 Epidemiologia:

Na América do Norte, por exemplo, são constatados cerca de 750.000 novos casos de sepse por ano, dos quais a maioria são admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI) e precisam de ventilação mecânica [5]. Pacientes portadores de sepse apresentam índice de mortalidade global de 30 a 50% e elevados custos hospitalares que podem chegar a 20 bilhões de dólares ao ano [6]. O choque séptico, devido à elevada taxa de mortalidade (40% a 60%), é o foco da medicina intensiva atual, sendo o seu tratamento e, principalmente, a sua prevenção, grande desafio [5]. Apesar de todos os esforços no seu tratamento clínico, representa a principal causa de óbito em pacientes críticos [7]. A sepse é a décima principal causa de morte em países de primeiro mundo, representando mais de 210 mil mortes anuais nos EUA [8]. No início da última década, a sepse foi a segunda causa de óbito em UTIs não cardiológicas e a décima causa global de morte nos Estados Unidos com mortalidade hospitalar de 47%, porém, a partir de 2002, com a instituição da Campanha de Sobrevivência da

Sepse (*Surviving Sepsis Campaign*), houve redução de 25% da mortalidade de sepse severa em 5 anos, ou seja, redução da mortalidade de 45,3% para 36,7%, devido às recomendações do diagnóstico e tratamentos precoces logo no início dos cuidados intensivos UTI [4]. Porém, mesmo a redução da mortalidade observada atualmente seus valores ainda permanecem inaceitavelmente elevados. A causa mais frequente de morte em pacientes com sepse grave é a disfunção orgânica, sendo o sistema respiratório responsável por 28,4% dos casos de óbito, seguido pelo cardiovascular (25,3%) e renal (23,1%). Houve redução da proporção dos pacientes com apenas uma disfunção orgânica de 72,4%, em 1993, para 58,2%, em 2003; enquanto a proporção de pacientes com disfunção orgânica múltipla aumentou em 2,7 vezes durante o mesmo período [9]. Uma estimativa revelou que a incidência de sepse global aumentou 8,7% ao ano, de 82,7 para 240,2 casos por 100.000 hospitalizações entre os anos de 1979 a 2000 [10]. Com incidência de cerca de trezentos casos para cada cem mil habitantes, representa a principal causa de internamentos em leitos de unidade de terapia intensiva (UTI) [6]. No Brasil, sua incidência é de cerca de 30,5% das admissões hospitalares em UTI, com taxas de mortalidade na vigência de sepse grave de até 34%, enquanto para os casos de choque séptico, a mortalidade varia de 52,2 a 65,3%, afetando pacientes com idade mediana de 65,2 anos, dos quais cerca de 58,7% são homens [11,12]. Embora as taxas de mortalidade hospitalar de sepse tenham diminuído nos últimos 20 anos, a incidência de sepse parece estar aumentando, variando de 900.000 a 3 milhões de novos casos nos EUA por ano, dependendo da metodologia epidemiológica empregada [13].

1.3 Critérios diagnósticos:

Para seu diagnóstico é necessário que o paciente possua alguns critérios definidos, além da presença de infecção documentada ou fortemente presumível (tabela 1) [14]. A presença de infecção pode ser documentada pela presença de culturas positivas de secreções como em infecções urinárias, peritonite, secreções brônquicas e/ou traqueais, hemoculturas, etc. Quando o quadro infeccioso é presumível, pois um patógeno pode não ser isolado em até 50% dos pacientes, há necessidade de fortes indícios clínicos de presença de alguma infecção de acordo com as manifestações clínicas do paciente, como também alguma imagem radiológica

confirmatória como, por exemplo, a de uma broncopneumonia observada em exames radiográficos ou tomografia computadorizada de tórax. A infecção pode ser definida pela microbiologia identificada ou suspeita por leucócitos em líquidos estéreis, perfuração de vísceras abdominais, critérios radiográficos na radiografia de tórax para pneumonia mais secreções purulentas ou por alta suspeita de infecção baseada em descobertas clínicas. O que também pode ser classificado de acordo com o modo de aquisição, ou seja, adquirido da comunidade ou nosocomial, incluindo casos originados dentro da UTI; da identificação dos agentes infecciosos, como pela forte suspeita, resultados clínicos ou de imagem, identificação cirúrgica ou microbiológica; e localização do órgão específico acometido [4]. É recomendado que sejam obtidas culturas microbiológicas adequadas antes de iniciar a terapia antimicrobiana em pacientes com suspeita de sepse ou choque séptico, se isso não resultar em atraso no início dos antimicrobianos, o que pode agravar o risco de mortalidade. As culturas podem ser obtidas do sangue, líquido cefalorraquidiano, urina, feridas, secreções respiratórias e outros fluidos corporais, que podem ser obtidos por broncoscopia ou cirurgia aberta [15]. Os agentes patogênicos mais comuns que causam choque séptico são bactérias gram-negativas, gram-positivas e micro-organismos bacterianos mistos, porém há condições específicas que colocam o paciente em risco de patógenos atípicos ou resistentes, como a candidíase invasiva em pacientes neutropênicos, ou infecções nosocomiais decorrentes do *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina [15].

Devido à falta de especificidade de algumas variáveis e ao curso do tempo variável durante o qual alguns critérios clínicos aparecem, o diagnóstico de sepse é muitas vezes fundamentado na história e evolução clínicas do paciente, o qual apresenta sinais clínicos de SIRS, ou seja, febre ou hipotermia; taquipneia; taquicardia; e leucocitose ou leucopenia, associada ou não a bastonetose. A progressão da doença pode ser rápida, pois o diagnóstico de infecção não é frequentemente claro no curto prazo e a doença grave pode levar o paciente rapidamente a um estado de choque séptico letal [16]. Sua evolução para sepse severa (tabela 2) é considerada na presença de sinais de insuficiência orgânica, com déficit de perfusão, acidose metabólica, oligúria e distúrbios neurológicos [14]. O choque séptico ocorre quando se institui uma hipotensão persistente e refratária a

reposição hídrica adequada com necessidade de utilização de drogas vasoativas como dopamina, epinefrina ou norepinefrina.

Tabela 1. Critérios de diagnóstico para sepse [14].

Infecção, documentada ou suspeita, e alguns dos seguintes:

Variáveis gerais:

Febre ($> 38.3^{\circ}\text{C}$)

Hipotermia (temperatura corporal $< 36^{\circ}\text{C}$)

Frequência cardíaca $> 90\text{bpm}$

Taquipnéia

Alteração do nível de consciência

Edema significativo ou balanço hídrico positivo ($> 20\text{ mL/kg}$ durante 24 horas)

Hiperglicemia (glicemia $> 140\text{mg/dL}$ ou $7,7\text{mmol/L}$) na ausência de diabetes

Variáveis inflamatórias

Leucocitose (> 12.000 leucócitos/ μL) ou Leucopenia (< 4000 leucócitos/ μL)

Bastonetose ($> 10\%$ de formas imaturas)

Proteína C reativa $> 2\text{x}$ o valor normal

Procalcitonina plasmática $> 2\text{x}$ o valor normal

Variáveis hemodinâmicas:

Hipotensão arterial (PAS $< 90\text{mmHg}$, PAM $< 70\text{mmHg}$, ou redução de PAS $> 40\text{mmHg}$)

Variáveis de disfunção orgânica:

Hipoxemia arterial ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$)

Oligúria aguda ($< 0,5\text{mL/kg/h}$ por pelo menos 2 horas, apesar de reposição líquida adequada)

Aumento da creatinina ($> 0,5\text{mg/dL}$ ou $44,2\mu\text{mol/L}$)

Anormalidades de coagulação (RNI $> 1,5$ ou KPTT $> 60\text{s}$)

Íleo adinâmico (ausência de sons intestinais)

Trombocitopenia (contagem de plaquetas $< 100.000/\mu\text{L}$)

Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total plasmática $> 4\text{mg/dL}$ ou $70\mu\text{mol/L}$)

Variáveis de perfusão tecidual:

Hiperlactatemia ($> 1\text{mmol/L}$)

Diminuição do enchimento capilar ou livedo reticular

PAS: pressão arterial sistólica; PAM: pressão arterial média; RNI: relação normalizada internacional; KPTT: tempo de tromboplastina parcial ativada.

Tabela 2. Sepses severa [14].

Definição de sepsis severa: hipoperfusão tecidual induzida por sepsis ou disfunção orgânica (qualquer uma das seguintes relacionadas à infecção):

Hipotensão induzida pela sepsis

Lactato sérico acima do limite laboratorial superior normal

Débito urinário < 0,5mL/kg/h por mais de 2 horas, apesar de reposição hídrica adequada

Lesão pulmonar aguda com $PaO_2 / FiO_2 < 250$ sem pneumonia como fonte de infecção

Lesão pulmonar aguda com $PaO_2 / FiO_2 < 200$ com pneumonia como fonte de infecção

Creatinina > 2,0mg/dL (176,8 μ mol/L)

Bilirrubina > 2 mg/dL (34,2 μ mol/L)

Contagem de plaquetas < 100,000/ μ L

Coagulopatia (RNI > 1,5)

PaO_2 (pressão parcial de oxigênio), FiO_2 (fração de oxigênio inspirado), RNI (razão normalizada internacional).

A caracterização e o diagnóstico adequado dos pacientes com sepsis persistem como desafio na medicina atual e muitos estudos buscam por biomarcadores da sepsis, que podem estar relacionados com um painel de proteínas desreguladas relacionadas com a produção de citocinas inflamatórias [17,19]. A sepsis é consequente de uma SIRS desencadeada por um quadro infeccioso em que nenhum biomarcador recebe uma forte recomendação para inclusão nos critérios diagnósticos devido à especificidade e/ou sensibilidade não serem muito elevadas. A falência de múltiplos órgãos e sistemas (FMOS) ocorre quando há falência múltipla de órgãos com coagulação intravascular disseminada, com risco de óbito eminente [19,20]. Os sinais clínicos de FMOS geralmente ocorrem tarde e os marcadores laboratoriais rotineiros, tais como PCR, lactato e pró-calcitonina, são de pouca ajuda no diagnóstico precoce de complicações graves, pois o aumento das suas

concentrações é observado com maior frequência no início dos sintomas clínicos [18]. Porém, vários estudos demonstraram que concentrações plasmáticas de mediadores imunológicos das respostas pró e anti-inflamatórias são significativamente elevados em pacientes com FMOS e geralmente precedem a ocorrência de sintomas clínicos em algumas horas, fenômeno denominado "janela de diagnóstico imunológico" (Fig. 1) [21].

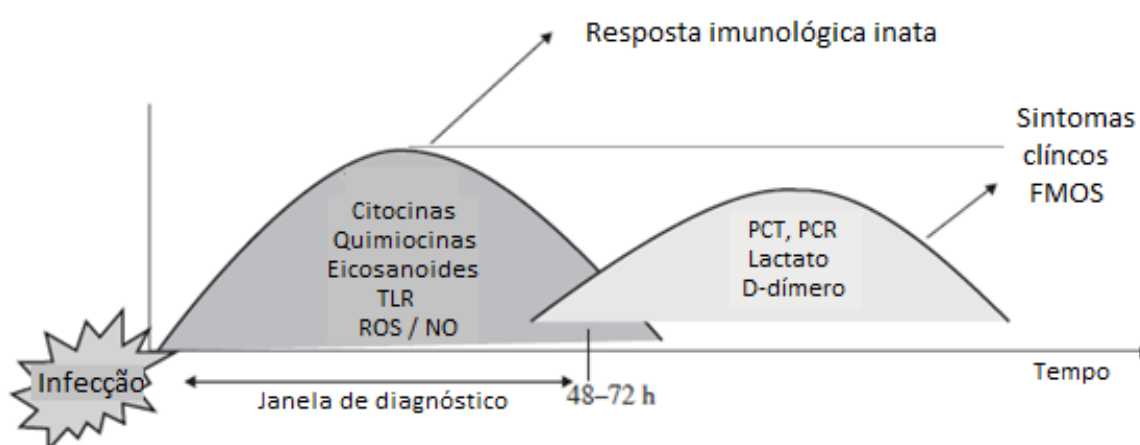


Figura 1. Resposta inflamatória em cascata. Decorrente de trauma e/ou infecção, incluindo indicadores imunológicos e a "janela de diagnóstico" (adaptado de Binkowska AM, 2015) [21].

A mortalidade entre os pacientes com sepse foi correlacionada com insuficiência orgânica ao longo do período da UTI. A disfunção orgânica desenvolveu-se frequentemente em pacientes com sepse e é o resultado de processos inflamatórios deletérios que ocorrem em resposta aos germes invasivos. Como exemplos de disfunções de órgãos comuns durante a sepse, pode-se citar funções renais, respiratórias, cardiovasculares, cerebrais, hematológicas e hepáticas [16,21]. A FMOS pode ocorrer de forma precoce decorrente de distúrbios imunológicos patológicos observados na SIRS, como também, de forma mais tardia, decorrente do desenvolvimento da síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória CARS (Fig. 2) [21,22].

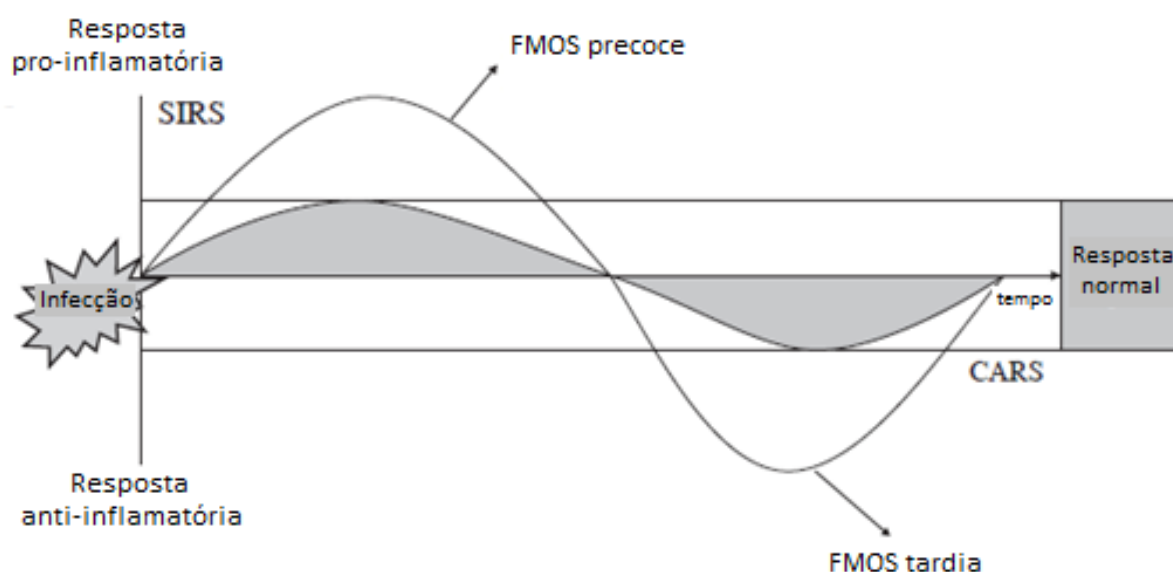


Figura 2. Dinâmica das mudanças na resposta SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica) e CARS (Síndrome da Resposta Anti-inflamatória Sistêmica) ao trauma e infecção, incluindo as reações fisiológicas e patológicas (adaptado de Binkowska AM, 2015) [21]. FMOS (Falência de Múltiplos Órgãos e Sistemas).

A medição de biomarcadores circulantes via um perfil relativamente simples de uma matriz de citocinas e / ou células circulantes adequadas pode ser um método prático para descrever o estado imunológico e inflamatório de um paciente séptico, o que pode ser ainda mais fidedigno na identificação de pacientes de alto risco de morte se combinado com os sistemas atuais de escores, tais como APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation), SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) e MEDS (Mortality in Emergency Department Sepsis) [13,23]. Na sepse o escore global médio do APACHE II foi de 18 ± 9 ; para sobreviventes 15 ± 8 e para não sobreviventes, 24 ± 9 [23]. Os escores APACHE II foram associados de forma significativa com óbito e um escore mais alto estava associado a maior probabilidade de óbito, porém estudos demonstram que seu uso de forma isolada é um instrumento de prognóstico de mortalidade controverso. Assim como o escore de SOFA, relacionado com o índice de mortalidade global, apresentou índices médios para SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico foram 3,99, 2,65, 4,90 e 8,12, respectivamente [23]. Critérios clínicos para identificação de pacientes sépticos usando o escore SOFA foram recentemente publicados, em que um aumento do $\text{SOFA} \geq 2$ está associado a sepse, enquanto no choque séptico, apesar da reanimação com líquidos, o paciente necessita de vasopressores para manter a

pressão arterial ≥ 65 mm Hg e lactato sérico ≥ 2 mmol/l [2]. Porém, como a precisão é diretamente relacionada com a fase da sepse, a ausência ou baixos níveis de biomarcadores pode ser preponderante como alerta na maioria dos pacientes [23]. Como também, TNF- α , IL-1 β e IL-6 não são considerados biomarcadores "padrão-ouro" de sepse devido à sua meia-vida curta [25]. Por exemplo, demonstrou-se que a sepse fúngica em recém-nascidos está associada ao aumento substancial das concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α , quando comparado com a sepse bacteriana [26].

1.4 Fisiopatologia:

1.4.1 Resposta *normal* à infecção:

A resposta normal do hospedeiro à infecção envolve um processo complexo, porém localizado, que controla a invasão bacteriana ao mesmo tempo em que realiza um reparo tecidual. Inicia-se com a ativação de células do sistema imunológico inato que reconhecem e se ligam a componentes microbianos invasores. Os leucócitos são considerados as principais células da resposta imunológica inata, compostos pelos monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos [27]. A ativação da imunidade inata é realizada pelos receptores de padrões de reconhecimento (*pattern recognition receptors* - PRRs) presentes na superfície das células imunológicas, capazes de reconhecer e se ligar a padrões moleculares associados a patógenos (*microbial-associated molecular patterns* - PAMPs) assim como a padrões moleculares associados ao dano (*pathogen-associated molecular patterns* - DAMPs) liberados nos tecidos infectados, o que inicia uma série de etapas que resultam na fagocitose e morte de bactérias invasoras, assim como fagocitose de detritos de tecido danificado. Os PRR mais estudados são os TLRs (*toll-like receptors*), particularmente o TLR-4, identificado como o receptor de lipopolissacarídeo (LPS), um composto de parede de bactérias gram-negativas, importante na resposta do hospedeiro às endotoxinas bacterianas [27]. Em consequência, há liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos envolvidos na resposta inflamatória do hospedeiro, como o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1); algumas quimiocinas como a molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula 1 de adesão celular vascular (VCAM-1); assim como, ocorre a liberação de óxido nítrico

(NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) [28,29]. Esta resposta também leva ao recrutamento de células inflamatórias adicionais, como leucócitos, porém de forma equilibrada, envolvendo mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que suprimem o agente infeccioso e restauram a homeostase com a cura do tecido [23].

1.4.2 Resposta exacerbada à infecção observada na sepse:

Quando há liberação de mediadores pró-inflamatórios em resposta à infecção que extrapolam os limites locais de forma incontrolável, levando a uma resposta generalizada e sistêmica, ocorre o desenvolvimento da sepse [3]. Além de resposta inflamatória exacerbada na tentativa de eliminar agentes patogênicos invasores, há também desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias do hospedeiro com intensa liberação de citocinas, conhecida como "tempestade de citocinas", resultado da SIRS que pode surgir logo no início dos processos de estabelecimento da sepse [2,30,31]. A toxicidade e toxinas das células de microrganismos, além dos efeitos das citocinas liberadas, induzirão uma grande quantidade de morte celular que liberará DAMPs cuja cascata de ativação amplificada será iniciada e rapidamente independente de qualquer estímulo proveniente do micro-organismo invasor, pois a liberação de citocinas inflamatórias induzirá nova produção e liberação de citocinas que, por sua vez, causará danos nos órgãos e órgãos [28]. Esta resposta do hospedeiro desregulada conduz a uma falha na homeostase circulatória que induz à disfunção e falência orgânica, que determina os sintomas do paciente e o curso clínico da doença [31]. Na fase inicial, a inflamação é muitas vezes uma síndrome predominantemente local que pode apresentar uma resposta sistêmica transitória mais ou menos pronunciada, porém com a instituição da SIRS, quando a inflamação é exacerbada e se torna sistêmica, há um quadro potencialmente prejudicial tendendo à instabilidade circulatória por vasodilatação devido à produção de óxido nítrico e à insuficiência micro circulatória contínua que predispõe a uma falência de múltiplos órgãos e sistemas (FMOS) [29,31].

O termo "tempestade de citocinas" refere-se a uma reação imunológica potencialmente fatal consistindo em um ciclo de *feedback* positivo entre citocinas e células imunológicas. Quando o sistema imunológico está atuando contra patógenos, as citocinas sinalizam células imunológicas, como linfócitos e macrófagos, para direcionarem-se ao sítio inflamatório, como também ativam estas mesmas células

estimulando uma produção adicional de mais citocinas efetoras o que pode tornar-se incontrolável e quantidades imensas de células imunológicas podem ser ativadas em um ínfimo espaço de tempo, danificando os órgãos próximos, como também, após atingirem a corrente sanguínea, podem induzir danos aos órgãos remotos onde ativam mais células inflamatórias que alimentam uma intensa inflamação sistêmica, descontrolada e frequentemente irreversível [7]. Portanto, este conceito descrito como “tempestade de citocinas” foi proposto para ilustrar os efeitos deletérios de uma resposta inflamatória descontrolada que desencadeia a produção exacerbada, sistêmica e potencialmente letal de citocinas, que pode resultar em disfunção ou falha orgânica, onde IL-1 β e TNF- α atuam em sinergismo desde o início deste evento inflamatório [32,33]. Essas citocinas aumentam a atividade pró-coagulante das células endoteliais vasculares, ativam os neutrófilos e aumentam a expressão de moléculas de adesão, promovendo o recrutamento de leucócitos, a alteração do epitélio e as lesões teciduais durante a sepse [23].

Na vigência de SIRS podem ocorrer lesões celulares generalizadas precursoras da disfunção orgânica que muitas vezes acomete os pacientes portadores de sepse, o que pode estar relacionado com mecanismos de isquemia tecidual por déficit de oxigênio; lesão celular direta por mediadores pró-inflamatórios e/ou outros produtos de inflamação; e desequilíbrio nos mecanismos de apoptose por morte celular programada [6]. Apoptose é uma característica proeminente da sepse e pode desempenhar papel vital na sua fisiopatologia. Embora a morte celular no sistema imunológico adaptativo possa ser benéfica para o hospedeiro, reafirmando a resposta inflamatória à sepse, a perda extensiva de células imunológicas pode comprometer a capacidade do hospedeiro de atuar contra os patógenos invasores, levando a um comprometimento das respostas imunológicas e aumento da mortalidade. Por outro lado, há um maior índice de morte de células parenquimatosas, incluindo as células epiteliais intestinais e pulmonares, com comprometimento da função de barreira, o que predispõe a translocação bacteriana intestinal, reduz as defesas naturais contra patógenos pulmonares e aumenta a apresentação de antígenos aos linfáticos associados ao intestino potencializando ainda mais a resposta imunológica [7].

Embora seja necessária uma resposta inflamatória localizada para a depuração da infecção, a falha de mediadores anti-inflamatórios para controlar o processo inflamatório pode levar à disfunção endotelial difusa com trombose

microvascular e aumento da permeabilidade celular, permitindo uma maior disseminação local e sistêmica tanto dos agentes patogênicos quanto das citocinas pró-inflamatórias [29,30]. Além disso, foi observado que, seguindo num curso de tempo variável, os pacientes que sobreviveram à SIRS inicial podem evoluir para um estado imunossupressor e anti-inflamatório durante o estágio posterior da sepse, descrito como síndrome de resposta anti-inflamatória compensatória (CARS), consequência do estado imunológico pró-inflamatório inicial do corpo durante a sepse, levando a uma resposta imunológica adaptativa defeituosa que torna os pacientes suscetíveis a infecções nosocomiais secundárias responsáveis por sua morte, o que ocorre de forma mais intensa e rápida em pacientes idosos portadores de comorbidades significativas e pacientes cirúrgicos e politraumatizados inflamatório [34,35,36,37]. Portanto, nos casos mais graves de infecção, isto é, durante a sepse, há um excesso de liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios por leucócitos ativados, células epiteliais e células endoteliais, decorrentes da "tempestade de citocinas", com efeitos deletérios, como disfunção orgânica, podendo levar a óbito [6].

1.4.3 Resposta endotelial:

Sabe-se que as células endoteliais vasculares emergiram como regulador dinâmico da homeostase vascular, na medida em que não têm apenas função de barreira para restringir o movimento de água, gases, proteínas e células sanguíneas entre os compartimentos intravasculares e intersticiais, pois também produzem e secretam ativamente mediadores que regulam ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, como o tônus vasomotor, angiogênese, inflamação e coagulação, o que pode ser afetado como também desregulado na sepse, levando a distúrbios hemostáticos, aumento do tráfego de leucócitos, amplificação da inflamação, alteração do tônus vasomotor e perda de função de barreira [30]. Ocorre alterações na microcirculação caracterizadas por perfusão heterogênea de tecidos com prejuízo na sua oxigenação, gerando áreas de tecido com hipóxia, mesmo na presença de fluxo sanguíneo preservado, o que potencializa a falência de certos órgãos, podendo a lesão celular endotelial ser considerada uma causa primária de dano orgânico induzido pela sepse [21].

Embora as células endoteliais normalmente possuam propriedades anticoagulantes que previnem a ativação e agregação de plaquetas, na vigência de sepse, elas estão envolvidas em vias patogênicas que levam a alterações patológicas da coagulação, com predisposição à formação de trombos, distúrbios dos processos de coagulação e fibrinólise prejudicada [25]. A proteína C anticoagulante natural é ativada na superfície da célula endotelial quando a trombina se liga à trombomodulina, uma glicoproteína transmembrana que transforma a trombina em potente ativador da proteína C. Na sepse, o sistema de proteína C é prejudicado, possivelmente devido à redução da síntese e aumento do consumo de proteína C, assim como da diminuição da sua ativação, resultante da menor expressão endotelial da trombomodulina e dos receptores de proteína C endotelial (*down regulation*). Na sepse, a glicoproteína pró-coagulante do fator tecidual (TF) pode ser liberada não apenas por monócitos e macrófagos, mas também por células endoteliais, enquanto que o inibidor da via TF, predominantemente expresso pelas células endoteliais, é inibido funcionalmente pela síntese reduzida de glicosaminoglicanos nas superfícies endoteliais [30]. Além disso, as plaquetas servem como potente amplificador da cascata de coagulação e a formação de trombo pode ser ainda facilitada por armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) liberadas de neutrófilos ativados. A formação de trombo microvascular pode resultar em isquemia de tecido, hipoperfusão de órgãos e falha no sistema de múltiplos órgãos [33]. Vale ressaltar que os NETs podem não só fornecer um andaime para a formação de trombos, mas também induzir a morte celular endotelial, efeito que parece ser mediado por proteases relacionadas com NETs ou proteínas catiônicas, como defensinas e histonas [7]. Portanto, a lesão celular vascular endotelial parece ser evento chave da patogênese da sepse, pois com sua ativação, promovem um estado pró-coagulante, antifibrinolítico e pró-adesivo, levando a mudanças na hemostasia, tráfego de leucócitos, inflamação, função de barreira e microcirculação cuja interrupção da integridade endotelial e do funcionamento pode desempenhar um papel crítico predispondo o desenvolvimento de disfunção orgânica associada à sepse.

1.4.4 Ativação de citocinas:

As citocinas podem ser produzidas por ampla gama de células, mas os produtores predominantes são macrófagos e células T auxiliares. As citocinas podem atuar sobre as células que as secretam, de forma autócrina; nas células e nos tecidos

próximos, de forma parácrina; e em células distantes, de forma endócrina, sendo que muitas vezes são produzidas em cascata, ou seja, a citocina produzida estimula suas células alvo a produzir citocinas adicionais, desempenhando ações pleiotróficas na regulação da imunidade inata e adaptativa [16]. As citocinas podem ser divididas em várias categorias: interleucinas, quimiocinas, interferons, fator alfa de necrose tumoral e fatores de crescimento, porém as interleucinas são o grupo mais importante de citocinas liberadas durante os processos infecciosos, das quais as interleucinas pró-inflamatórias devem ser responsáveis pela ativação celular, dano tecidual e necrose, enquanto as anti-inflamatórias visam amortecer e finalmente reverter o processo inflamatório [26,27]. As citocinas pró e anti-inflamatórias são liberadas precocemente na sepse de forma a manifestar sinais de imunossupressão no estágio agudo de doença, evidenciando-se que a sepse não progride ao longo de um padrão de doença pré-estabelecida, mas como processo biológico dinâmico em que pode alternar entre hiperatividade imunológica ou imunossupressão e um desvio inadequado da homeostase em qualquer direção pode resultar em morte [24]. As citocinas pró-inflamatórias induzidas pela detecção microbiana induzem a produção de vários outros mediadores, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenases, lipoxigenases, eicosanóides e fator ativador de plaquetas. Esses fatores atuam via receptores associados à proteína G e mantêm a inflamação, aumentam o fluxo sanguíneo, a tonicidade vascular e a permeabilidade [31]. Além disso, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são liberadas durante o processo de inflamação, como o ânion superóxido, produzido pela NADPH oxidase, que oxida e altera proteínas e ácidos graxos insaturados de lipídios; e o óxido nítrico (NO), produzido pela NO sintetase induzível (NOi), que contribui para a lesão microvascular, hipo-reatividade vascular e disfunção orgânica por indução de apoptose [16].

As citocinas pró-inflamatórias são determinantes na patogênese da sepse, mesmo não havendo consenso dos mediadores mensuráveis na corrente sanguínea, assim como dos reais mecanismos envolvidos tanto na progressão da doença, quanto no estabelecimento de um estado anti-inflamatório compensatório [38]. Sabe-se que o sistema neuroendócrino também é ativado para produzir glicocorticoides circulantes, que podem interferir negativamente com o sistema imunológico [16]. Paralelamente à resposta inflamatória, uma série de citocinas anti-inflamatórias e receptores solúveis também são produzidos, os quais estão envolvidos na supressão da resposta

imunológica subsequente à sepse, o que pode ter efeito protetor contra o choque e a inflamação sistêmica. Porém, se esta resposta anti-inflamatória for muito intensa e prolongada pode haver danos ao indivíduo, o que pode ser observado com a CARS [35,36]. Portanto, com a instituição da sepse, a primeira fase é predominantemente relacionada a SIRS e associada à liberação excessiva das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) na corrente sanguínea, enquanto a segunda fase da resposta imunológica é caracterizada por CARS e é mediada pela secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10) [27]. Os mecanismos imunológicos primários incluem acentuada estimulação da cascata inflamatória com regulação positiva das citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6, seguida por instabilidade hemodinâmica secundária à vasodilatação e a desregulação da coagulação e da fibrinólise, contribuintes fundamentais para hipoperfusão tecidual e lesão orgânica [20].

Entre as numerosas citocinas pró-inflamatórias estudadas durante a sepse, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-17 são de importância crucial. A IL-1 β , também conhecida por catabolina, atua pela ativação do receptor de IL-1 que leva ao aumento da atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B) com promoção da cascata de amplificação que induz a síntese de vários genes inflamatórios tais como IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2, IL-1a, IL-1 β e MKP-1 [28]. O NF- κ B desempenha papel central nos processos da inflamação através da sua capacidade de induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios. NF- κ B é ativado por uma grande variedade de estímulos incluindo patógenos microbianos, que são reconhecidos pelos TLRs e citocinas inflamatórias, que são reconhecidos por seus receptores de membrana específicos, como o receptor de TNF- α [28]. Em células quiescentes, o NF- κ B reside como um complexo citoplasmático latente ligado à sua proteína inibitória (I κ B). Os estímulos imunológicos, como a endotoxina, desencadeiam uma série de eventos de sinalização que culminam com a liberação de NF- κ B que conduz à regulação da síntese de múltiplas moléculas inflamatórias por sua ação no DNA nuclear, tais como TNF- α , IL-6, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e moléculas de adesão [7]. Durante a sepse, as concentrações plasmáticas de IL-1 β mostraram ser maiores em pacientes que morreram do que em sobreviventes, sugerindo associação de elevadas concentrações de IL-1 β com maus resultados na sepse [28].

A IL-6, cuja principal fonte são os macrófagos teciduais, é fortemente induzida durante a sepse e possui algumas propriedades anti-inflamatórias, pois induz a liberação de proteínas de fase aguda, como proteína C reativa (PCR), que limita a inflamação. Mas, ao mesmo tempo, a IL-6 também pode induzir insuficiência cardíaca durante a sepse meningocócica [39]. As proteínas de fase aguda são constituídas por uma grande quantidade de antagonistas dos receptores e receptores solúveis, tais como a IL-1Ra; proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP); CD14 solúvel; e receptores solúveis de TNF. Suas concentrações plasmáticas aumentam durante a sepse, mas ainda não está claro se esta regulação positiva é suficiente para suprimir as citocinas pró-inflamatórias [30]. Concentrações elevadas de IL-6 foram observados em muitas doenças inflamatórias, como doenças cardiovasculares, doenças autoimunes ou câncer e, da mesma forma que a IL-1 β , concentrações consistentemente elevadas de IL-6 mostraram-se associados à gravidade da sepse, estando as concentrações mais altas associadas aos piores resultados. A contribuição exata da IL-6 para a sepse ainda está sob investigação e possivelmente está ligada à ativação da via do complemento com extravasamento capilar [28]. A IL-12 também é elevada durante a sepse, sendo produzida por células dendríticas, macrófagos e células linfoblastoides e induz a diferenciação de células T em células do tipo 1 (Th1), além de ativar as células NK, originando grande quantidade de INF γ [26]. O INF- γ é produzido principalmente por células T CD4 e CD8, como também em menor quantidade pelas células NK, sendo usualmente usado para definir células tipo Th1. O INF- γ promove a resposta inflamatória durante a sepse, porém sua produção pode ser atenuada na sepse, provavelmente devido à redução da resposta dos linfócitos durante o estado imunossuprimido [28].

As interleucinas anti-inflamatórias mais estudadas são IL-1RA, IL-4 e IL-10. A IL-1RA é secretada por células imunológicas ou células epiteliais e liga-se a IL-1R, bloqueando assim a ação dos sinais inflamatórios IL-1 α ou IL-1 β . A IL-4 é produzida principalmente por células T e promove a proliferação de células B e T e uma mudança das células T para um perfil Th2, porém seu papel na sepse está não foi ainda bem definido [28]. IL-10 é a citocina anti-inflamatória central com capacidade de bloquear a produção de citocinas inflamatórias por células mieloides, células NK e células T sendo que a presença de elevadas concentrações está associada a imunossupressão induzida por septicemia [29]. IL-10 e TGF- β 1 são duas importantes citocinas anti-

inflamatórias observadas na sepse experimental e humana, com alto potencial inibidor de leucócitos e seu aumento tem sido associado a mau prognóstico e déficits de imunidade na sepse [40,41,42]. A IL-10 foi inicialmente descrita como fator inibidor de síntese de citocinas produzido por células T *helper* (Th) 2 para inibir células Th1 [43]. Porém os efeitos anti-inflamatórios da IL-10 incluem a prevenção da produção de moléculas inflamatórias tais como IFN- γ , IL-1 β , IL-8, IL-12, TNF- α e ROS por monócitos e macrófagos [44]. As concentrações plasmáticas de IL-10 foram encontradas aumentadas nos pacientes com sepse e determinou-se que seus altos níveis plasmáticos estão relacionados a maior gravidade e FMOS [45]. O TGF- β 1, que regula a ativação imunológica de leucócitos, é altamente produzido por células T reguladoras (T_{reg}) ativadas e também é um fator obrigatório para a sua própria diferenciação celular [46]. Células T_{reg} são convencionalmente classificadas como células da "imunidade adaptativa", com capacidade de ativação e proliferação rápidas que confere-lhes influência direta à imunidade inata, sendo geralmente representados pela expressão dos seus receptores CD3, CD4, CD25 e o fator de transcrição Foxp3. As células T_{reg} fornecem citocinas essenciais que suprimem a resposta de outras células imunológicas. A importância dessas citocinas anti-inflamatórias foi demonstrada experimentalmente, já que a neutralização de TGF- β 1 ou IL-10 promoveu diminuição de células T_{reg}, restauração da população de células T CD4⁺ esplênicas e melhores taxas de sobrevivência em estudos experimentais com camundongos sépticos [47].

1.4.5 Papel das células NK:

As células NK são uma classe de linfócitos com capacidade de vigilância, citotoxicidade e produção de citocinas. São linfócitos granulares grandes capazes de reconhecer e induzir a morte de células anormais ou infectadas e também fonte importante de citocinas. A atividade de citotoxicidade contra células anormais foi descrita pela primeira vez por Miller e colaboradores em 1971, quando notaram que células esplênicas de ratos podiam "naturalmente" identificar e matar células tumorais *in vitro*, sendo que o conceito de um subconjunto de leucócitos denominados células assassinas naturais (NK) foi descrito alguns anos depois [48]. Poucos anos depois, a célula NK correspondente humana foi identificada em citometria de fluxo utilizando-se os marcadores CD3⁻/CD56⁺ [49]. O repertório do receptor de células NK confere um status de vigilância eficiente para distinguir rotineiramente células saudáveis e

anormais, sendo diretamente ligado ao sistema imunológico inato [50]. Além de compartilhar uma origem celular comum com as células T, as células NK compartilham também um mecanismo de morte comum com linfócitos T CD8⁺, com secreção de perforinas e granzimas, e um sistema similar de secreção de citocinas com os linfócitos T CD4⁺, com secreção do IFN- γ [51]. Embora o estado imunológico de monócitos, linfócitos e neutrófilos esteja bem caracterizado em SIRS e pacientes com sepse, pouco se sabe sobre o de células NK nesses pacientes. Em humanos, foram descritos pelo menos dois subconjuntos de células NK circulantes, CD3⁺CD56^{dim} e CD3⁺CD56^{bright}. As células NK CD56^{dim} exibem citotoxicidade aprimorada e as células NK CD56^{bright} produzem maiores quantidades de citocinas [52,53].

As células NK quando ativadas atuam tanto pela sua atividade citotóxica quanto pela produção de citocinas específicas e são capazes de reconhecer células anormais como vírus e células transformadas ou infectadas por bactérias. Uma sequência de receptores ativadores e/ou inibitórios quando ativados por ligantes disponíveis na superfície da célula alvo, integra os caminhos de transdução de sinais desses receptores, determinando se a célula NK inicia o processo de morte ou tolerância. Na homeostase natural, as células NK circulantes maduras expressam grânulos citotóxicos intracelulares que carregam granzimas e porfirinas para uma rápida resposta citotóxica desencadeada em poucos minutos sem necessidade de fatores de transcrição ou tradução [53]. Em relação à produção de citocinas, as células NK foram consideradas os principais e primeiros produtores de IFN- γ , o qual pode estar pré-armazenado e imediatamente disponível para iniciar sua produção após a ativação celular [54].

As células NK são capazes de induzir morte celular em células alvo que expressam antígenos *non self* via molécula de MHC do tipo 1. O papel das células NK na imunidade inata bacteriana foi aceito mais tarde, pois os TLRs foram recentemente descobertos como expressos por células NK, o que abriu novo interesse por seu envolvimento neste tipo de resposta imunológica às infecções bacterianas [55]. Em contraste com os fagócitos, a ativação de células NK por PAMPs só pode ocorrer dentro de uma complexa rede de ativação compartilhada com outras células imunológicas que oferecem um microambiente de citocinas necessário para a capacidade de resposta das células NK [56]. Várias células acessórias foram descritas como fonte de sinais de ativação para células NK, tais como células dendríticas (DCs),

PMN, macrófagos, mastócitos, células epiteliais, linfócitos B e T, incluindo T_{reg} (figura 3). As células NK são ativadas dentro de uma rede de células acessórias que detectam os PAMPs. A ativação de células acessórias leva à produção de citocinas que contribuem para a ativação funcional das células NK, enquanto a detecção de PAMPs pelas próprias células NK aumenta sua reatividade [57]. Todas as citocinas listadas na figura demonstraram amplificar a atividade das células NK, sozinhas ou em sinergia [58]. Os sinais negativos podem ser entregues diretamente a células NK, como por exemplo, IL-10 e TGF β produzidas por células T reguladoras (T_{reg}), prostaglandinas, e glicocorticoides; ou indiretamente por regulação negativa da função de células acessórias [56,59]. O estado de imunossupressão que caracteriza a sepse também está associado ao aumento das populações de células supressoras, dentre as quais destacam-se as células T reguladoras CD4⁺ e CD8⁺ T (T_{regs}), as quais desempenham papel importante na supressão da reatividade imunológica em muitas doenças. O que fundamenta o fato de que os mesmos agentes que contribuem para combater a infecção podem atuar sinergicamente, levando a um quadro deletério de inflamação sistêmica aguda, o que é particularmente observado com a liberação de IFN- γ , uma das principais citocinas produzidas por células NK [52,58].

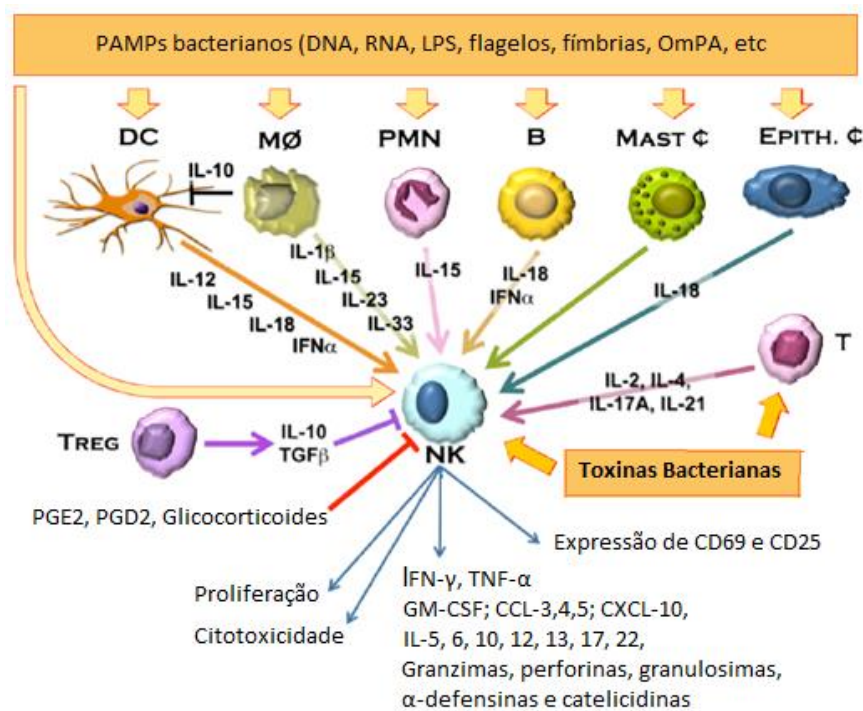


Figura 3. Ativação de células NK. (PAMP) padrões moleculares associados aos patógenos [56].

É possível que os subconjuntos de células NK não sejam equivalentes na sua atividade antibacteriana, pois demonstrou-se que, em resposta ao BCG, as células NK CD56^{bright} humanas (imaturas) eram aquelas envolvidas principalmente na produção de IFN- γ , enquanto o subconjunto CD56^{dim} (maduras) continha maiores concentrações plasmáticas de perforina e granzima [60]. A diferenciação e a função das células NK são influenciadas pelo ambiente de tecido, sendo observado que ambientes celulares e moleculares específicos no útero, fígado, baço, pulmões ou sangue influenciam a natureza precisa das células NK [58]. Além disso, diferenças foram observadas entre as espécies, pois a maioria das células NK humanas e murinas são geralmente derivadas de diferentes compartimentos, em que a maioria dos parâmetros de células NK humanas foram adquiridas de células derivadas do compartimento sanguíneo, enquanto as murinas foram principalmente provenientes do baço, destacando-se que o ambiente sanguíneo em camundongos e seres humanos é muito diferente, com o plasma murino favorecendo a resiliência de camundongos à infecção bacteriana [61].

1.4.6 Fatores clínicos que interferem na resposta do hospedeiro à sepse:

A resposta do hospedeiro a infecção envolve processos complexos relacionados ao sistema imunológico por meio de ativação celular e liberação de citocinas que, quando ocorrem de maneira sistêmica e descontrolada, há o estabelecimento da sepse. O entendimento dos processos que envolvem o desenvolvimento da sepse ainda não é totalmente elucidado, porém sabe-se que há múltiplos fatores clínicos inerentes ao hospedeiro que podem interferir nas respostas imunológicas. Pacientes que desenvolvem um quadro séptico são frequentemente acometidos por outras comorbidades sendo a associação de desnutrição e certas carências de nutrientes frequentemente observados em pacientes hospitalizados, o que podem interferir na resposta imunológica à infecção, como também no prognóstico do seu tratamento. A infecção que origina o processo inflamatório sistêmico observado na sepse pode instalar-se em pacientes que apresentam alguma deficiência nos seus mecanismos inatos de defesa imunológica, o que pode ser observado em indivíduos deficientes / insuficientes de vitamina D (VD), fato abordado com maiores detalhes no anexo 7. Cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo possui insuficiência e/ou deficiência de VD, sendo a insuficiência presente em quase 100% dos pacientes críticos portadores de sepse [62]. Como pacientes críticos tem

menores concentrações de VD do que pessoas saudáveis, propõem-se que concentrações adequadas de VD podem desempenhar um papel protetor importante nestes pacientes, ainda que concentrações reduzidas de VD observados na sepse podem decorrer do maior catabolismo proteico, com redução das concentrações da proteína de ligação da vitamina D (VDBP), relacionado com sepse precoce e de pior prognóstico [63]. Por outro lado, pacientes críticos possuem menor exposição à luz solar e ausência de suplementação alimentar adequada, como também há variações anuais nas concentrações plasmáticas, sendo máximas no outono e menores após o inverno, observando-se menor taxa de letalidade por sepse no verão [64,73]. Foi observado que a deficiência prévia à admissão hospitalar de VD relaciona-se com maior mortalidade e maior positividade de hemoculturas em pacientes críticos, mesmo após ajustes de comorbidades relevantes, sendo um preditor significativo e independente de sepse, com o risco de mortalidade 1,9 vezes maior nos indivíduos deficientes [62,65]. Em pacientes graves a deficiência pode causar um efeito aditivo nos resultados com maior tempo de internação; aumento dos custos hospitalares; piora de prognóstico; predisposição às infecções por *Staphylococcus aureus* e *Clostridium difficile*; e aumento da mortalidade [66]. A relação causal não é conhecida, mas sabe-se que há aumento de interleucinas pró-inflamatórias, com efeitos adversos sobre o estresse oxidativo e aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial, importantes na patogênese da sepse, pois a VD possui efeitos antiproliferativos das células T pela alteração no RNAm, inibindo a proliferação de células Th1 / Th17 com redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-17) com desvio da produção de citocinas do fenótipo Th2 e aumento das citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) [67,68,69]. A VD impede a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a capacidade antibacteriana dos macrófagos, potencializando a expressão dos receptores TLR (*toll like receptors*) e suas respostas antibacterianas, com a produção dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) catelicidina e β -defensinas, importantes na resposta imunológica inata do trato respiratório na defesa contra infecções [62,63,64]. Porém, pacientes sépticos apresentam deficiência da VD em até 96,15% dos casos, com menor concentração plasmática durante os momentos de pico de infecção e consequente redução destes efeitos no sistema imunológico, com comprometimento da produção dos PAM, o que pode influenciar diretamente o prognóstico e a morbimortalidade destes pacientes [65,66]. Notou-se que após pré-tratamento com VD, há redução da produção de

citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-8) induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) e inibição da ativação da via de NF- κ B, sugerindo que, devido as múltiplas funções da VD no sistema imunológico em resposta à infecção, sua suplementação pode ser um componente integral no combate à sepse [67,68,69].

Outro fator que possui relações diretas da resposta do hospedeiro às infecções é o estado nutricional dos pacientes portadores de sepse. A dosagem da concentração plasmática de albumina é frequentemente utilizada como marcador nutricional em pacientes críticos, apesar de não ser muito preciso, pois sua vida média é de 18 a 21 dias. Trata-se de proteína constitucional produzida endogenamente e com grande capacidade de transporte no plasma, onde também exerce efeitos osmóticos. A dosagem plasmática de albumina, é frequentemente utilizada como marcador nutricional dos pacientes hospitalizados, pois representa 50 a 60% das proteínas plasmáticas e suas concentrações reduzidas podem estar relacionadas com a desnutrição clínica e maior morbimortalidade. Muitas vezes o paciente, ao ser internado, já se encontra desnutrido e, como o processo de desnutrição é contínuo, o quadro de desnutrição pode se agravar ou, caso não apresente no momento da internação, pode adquirir a desnutrição com o decorrer do seu tratamento. No Brasil, há prevalência média de 48,1% de desnutrição hospitalar, sendo que nos pacientes críticos em UTI, o quadro se agrava e pode chegar a 100% [70]. Por isso medidas e condutas de triagem e terapia nutricionais adequadas são extremamente importantes, principalmente em pacientes críticos portadores de sepse que, devido ao seu quadro catabólico intenso, há necessidade de preservação de tecido muscular e, conseqüentemente, das funções orgânicas para o paciente ter condições clínicas, nutricionais e imunológicas de combate às infecções sistêmicas. Porém, como a albumina tem sua síntese hepática reduzida em quadros inflamatórios de pacientes portadores de sepse, ou seja, trata-se de proteína de fase aguda negativa, o que também pode justificar ou potencializar sua correlação com as taxas de morbimortalidade observadas na sua deficiência, o uso isolado da concentração plasmática de albumina como marcador de desnutrição nestes pacientes pode não ser adequado [71,72]. A contagem total de linfócitos (CTL) ou linfometria é utilizada para avaliar a competência imunológica e está relacionada com o perfil nutricional dos pacientes, possibilitando dar uma estimativa das reservas imunológicas momentâneas e as condições do mecanismo de defesa celular orgânica, sendo

considerada depleção leve, quando o número de linfócitos está entre 1200 a 2000/mm³; moderada, 800 a 1199/mm³; e depleção grave, para valores menores que 800/mm³ [14,15]. Pacientes portadores de sepse possuem intensa resposta inflamatória com múltiplos mecanismos de redução dos linfócitos circulantes, tais como maior adesão endotelial e apoptose [6,16].

1.5 Tratamento da sepse:

Como ocorre em pacientes politraumatizados, com infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral, a velocidade e a adequação do tratamento administrado nas horas iniciais do desenvolvimento da sepse influenciam diretamente seu resultado e prognóstico. Observa-se atualmente aumento na incidência de sepse de cerca de 9% ao ano com necessidade cada vez maior de antibióticos mais potentes e com maior espectro, afetando diretamente a eficácia do seu tratamento [8,16,20], por isso há muitos esforços na procura de se desenvolver estratégia de tratamento mais direcionada e eficiente. Embora existam algumas controvérsias no adequado manejo do paciente portador de sepse, principalmente no que diz respeito à sepse severa e ao choque séptico, a administração rápida de antibióticos; a identificação precoce da fonte de infecção e, quando possível, o seu controle; a reanimação imediata com reposição hidroeletrólítica adequada; e as equipes de cuidados multidisciplinares são universalmente aceitas como cuidados apropriados [20].

1.5.1 Terapia antimicrobiana:

Para tratamento adequado da sepse, o combate rápido e eficaz da infecção ativa é fundamental, o que pode ser iniciado com terapia antibiótica empírica endovenosa (EV) assim que obtidas amostras para culturas apropriadas já que estudos afirmam que o tempo para iniciar a terapia antimicrobiana apropriada é o mais forte indicador de mortalidade, tendo seus menores índices quando são utilizados antibióticos específicos para o germe causal já na escolha inicial [6]. O tratamento empírico é iniciado após estimar a probabilidade de que um organismo específico seja a causa da sepse, conforme estudos estatísticos da comunidade hospitalar em questão através de dados de coloração de Gram e padrões de resistência locais,

pesando-se os riscos e/ou benefícios do uso do antibiótico escolhido. Para isso é importante detalhes da história clínica do paciente, como por exemplo, o histórico de uso de antibióticos recente; presença ou não de comorbidades (hipertensão arterial, doença arterial coronariana, insuficiência renal, diabetes *melitus*, imunossupressão, etc.); o contexto clínico da infecção, ou seja, se é adquirida da comunidade ou nosocomial (infecção adquirida na internação atual ou internação prévia recente); histórico de alergias a algum antibiótico utilizado previamente ou se o paciente possui algum fator de risco para uso do antibiótico [3]. Uma vez que um patógeno é isolado, realiza-se o “descalonamento” do antibiótico, ou seja, a adequação antimicrobiana conforme a positividade das culturas previamente solicitadas, o que está associado a menores taxas de mortalidade. O tempo do tratamento com antibióticos é variável dentro de diferentes centros, variando-se de 5 a 7 dias para até 10 a 14 dias conforme o germe isolado, evolução clínica do paciente e gravidade do caso [6].

1.5.2 Reposição hidroeletrólítica:

A administração de fluidos a pacientes com sepse grave deve ser feita de maneira adequada evitando-se lesões iatrogênicas. Embora tradicionalmente uma reposição fluida agressiva seja considerada a melhor abordagem inicial para a hipotensão na sepse, não há consenso na literatura que grandes volumes infundidos ($> 30\text{mL/kg}$) melhoram de forma confiável a pressão arterial, o débito urinário e a perfusão sanguínea, pois esta abordagem pode levar à insuficiência respiratória por edema agudo de pulmão, principalmente se há algum comprometimento da função renal [15]. A radiografia de tórax, a pressão venosa central (PVC), a saturação venosa central de oxigênio e a ultrassonografia para avaliar o índice de colapso da veia cava, são úteis como forma de monitoramento, mas com valor limitado na avaliação da capacidade de resposta do fluido. O lactato sérico é frequentemente usado como marcador de déficit de perfusão e hipóxia tecidual na sepse, estando também relacionado à resposta ao estresse metabólico [14]. Estudos indicam que cerca de 50% dos pacientes hemodinamicamente instáveis são sensíveis a fluidos, porém para os outros quase 50% dos pacientes hemodinamicamente instáveis, o excesso de líquidos pode ser prejudicial, pois grandes volumes podem diminuir a conformidade diastólica dos ventrículos, reduzir a elasticidade arterial efetiva e a resistência vascular sistêmica, fazendo com que a PVC aumente mais do que a pressão média de enchimento circulante, diminuindo paradoxalmente o retorno venoso, prejudicando a

função de certos órgãos encapsulados como rins e fígado, além de maior extravasamento para o terceiro espaço, aumentando o edema periférico nos tecidos. Embora a escolha do fluido em pacientes com sepse grave e choque séptico também seja controversa, a solução salina normal (NaCl 0,9%) é o cristalóide mais utilizado em todo o mundo, mesmo estando seu uso quando em excesso ou inadequado associado a acidose metabólica hiperclorêmica, redução do fluxo sanguíneo renal com aumento do risco de insuficiência renal e aumento de mortalidade [6]. As soluções de amido sintético aumentam o risco de insuficiência renal e morte em pacientes com sepse e devem ser evitadas. O uso de albumina a 20% tem mostrado tendências de redução do índice de mortalidade em pacientes com choque séptico, comparativamente ao uso de cristaloides, pois é uma das poucas terapias que pode restaurar o glicocálix endotelial em sistemas experimentais, embora seus custos para uso indiscriminado sejam elevados e faltam dados clínicos de alto nível que apoiem esta recomendação [15]. Tendências recentes na literatura de cuidados intensivos apontam para uma forma terapêutica em que "menos é mais", cujos objetivos são intervenções para manter ou restaurar a fisiologia normal, com valorização dos mecanismos compensatórios e evitando-se a sobrecarga volêmica [6].

1.5.3 Vasopressores e agentes inotrópicos:

A pressão arterial média (PAM) reduzida é um indicador confiável para desenvolvimento de disfunção orgânica, pois quando seus valores caem abaixo do limiar de tolerância de um órgão, ocorre redução do fluxo sanguíneo e consequente isquemia [6]. A maior mortalidade observada em portadores de choque séptico está associada a níveis baixos de PAM (< 65mmHg), já que para um bom funcionamento do coração, cérebro e rim a PAM deve ser mantida em valores acima de 60mmHg, principalmente em pacientes com hipertensão arterial crônica [16]. Por isso sugere-se manter a PAM inicial entre 65 a 70mmHg para pacientes com choque séptico e, para pacientes com história de hipertensão crônica, uma PAM ligeiramente maior, entre 80 a 85mmHg. A norepinefrina é o vasopressor de escolha para pacientes com choque séptico, pois a dopamina aumenta o risco de arritmias e morte, devendo ser evitada na maioria dos casos e a fenilefrina não é recomendada como primeira linha, pois está relacionada com diminuição do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo renal e esplâncnico. A norepinefrina eleva o tônus arterial vascular, aumentando a pressão arterial e o fluxo sanguíneo, com melhora do retorno venoso e do débito cardíaco [6].

Como a capacitância venosa é muito mais sensível à estimulação simpática do que a resistência arterial vascular, baixas doses de agonistas de receptores adrenérgicos α -1 causam mais venoconstrição do que vasoconstrição arterial, sendo o aumento do volume plasmático após o uso de norepinefrina muito mais devido à mobilização do sangue recuperado do que um volume de solução cristalóide infundida de vida curta, gerando um efeito no retorno venoso mais duradouro e não associado ao edema tecidual. Embora estudos indiquem que o uso precoce da norepinefrina em pacientes com choque séptico seja forte indicador de sobrevida, para pacientes com hipotensão persistente e função ventricular hiperdinâmica com falha grave no tônus vasomotor, um segundo vasopressor pode ser necessário, como a vasopressina em dose fixa de 0,03UI min, uma segunda opção razoável a ser iniciada, pois inverte a "deficiência relativa de vasopressina" observada no choque séptico aumentando a sensibilidade adrenérgica [15].

1.5.4 Corticosteroides:

A sepse ativa o sistema nervoso simpático levando à liberação endógena de catecolaminas e cortisol pelas glândulas adrenais [6]. O cortisol, principal glicocorticoide endógeno, reduz a produção de citocinas inflamatórias pela inibição do NF- κ B. Alguns dos corticosteroides utilizados no tratamento da sepse são a hidrocortisona, metilprednisolona e prednisona, cujos regimes de dosagem variam consideravelmente nos estudos, apresentando elevadas doses ao longo das primeiras 48 a 72 horas para, em seguida, as reduzirem gradualmente ao longo de uma a duas semanas [13]. O uso de corticosteroides no tratamento da sepse faz parte da prática clínica há décadas, principalmente na presença do choque séptico dependente de vasopressores, quando seu uso precoce (dentro das primeiras 72h após o início do choque) está relacionado à redução da mortalidade, embora os dados da literatura não sejam definitivos e perfeitamente claros, em consequência de uma população heterogênea de pacientes sépticos [6]. O uso de corticosteroides em doses elevadas pode reduzir a ativação NF- κ B associada à sepse pulmonar, mas está relacionada a um aumento significativo da apoptose celular induzida pela sepse em tecidos pulmonares e esplênicos, o que sugere que o aumento do processo de apoptose celular durante a sepse pode ser exacerbado quando os glicocorticoides são administrados em altas doses, sendo potencialmente prejudicial o seu uso indiscriminado na sepse [7].

1.5.5 Estudos e desafios no tratamento da sepse:

Vários pesquisadores afirmaram que a prevenção da imunossupressão pode ter papel no tratamento da sepse [20]. O TNF- α mostrou contribuir para a mortalidade em modelos animais de sepse, onde a sua neutralização por anticorpos ou o uso de ratos *knockout* TNF- α resultou em melhor resultado [73]. O primeiro estudo que aplica o anticorpo para o TNF- α em modelo experimental de sepse experimental mostrou certa prevenção do choque séptico letal durante bacteremia de *E. coli* [74]. No entanto, para ensaios clínicos, a neutralização do TNF- α em pacientes com sepse não resultou benefícios significativos na sobrevida [75]. O que pode ser decorrente da discrepância nos horários da administração do anticorpo, pois em modelos animais, foi administrado antes da indução da sepse, enquanto nos pacientes, após o início da doença, quando a cascata inflamatória já estava instituída. A IL-1 β , assim como a IL-18 e o TNF- α , possui intensa participação na “tempestade de citocinas”. A neutralização de IL-1 β em modelos experimentais de sepse pela injeção de antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) demonstrou alguma melhora da sobrevida dos animais [76]. No entanto, ensaios clínicos em pacientes humanos não revelaram benefícios significativos contra um grupo placebo. Da mesma forma, a neutralização da IL-18, em modelos animais de sepse Gram positiva ou Gram negativa, mostrou promissora redução da letalidade [77]. No entanto, a neutralização desta citocina em pacientes com sepse não foi investigada, sendo a intervenção nos efeitos da IL-18 na sepse um desafio promissor devido ao seu papel na indução da produção de IFN- γ por células NK. O IFN- γ é particularmente importante para o ambiente inflamatório devido às suas propriedades para ativar e restaurar as funções imunológicas dos macrófagos, tendo efeitos no aumento da letalidade em estudos experimentais com ratos infectados com endotoxina [78]. O IFN- γ tem seu efeito potencializado pelo TNF- α e IL-1 β amplificando sua resposta pró-inflamatória durante a sepse, podendo ser utilizado no tratamento da sepse com efeitos positivos na sobrevida [20]. Os eventos que desencadeiam a produção exacerbada de citocinas são a detecção de produtos microbianos através dos PRR, dos quais o TLR4 é considerado um grande sensor envolvido na doença inflamatória deletéria induzida pela sepse consequente de infecção por germes Gram negativos. Num ensaio clínico em 274 pacientes de 93 centros diferentes de UTI, utilizou-se inibidor da sinalização mediada por TLR4 (TAK-242) com objetivo de suprimir a tempestade de citocinas e melhorar a sobrevivência

em paciente com sepse grave, porém, não houve nenhuma diferença significativa de melhoria de sobrevida nem diminuição da produção de citocinas [79]. Provavelmente porque o simples bloqueio da resposta dependente de TLR4 não é suficiente pois a inflamação sistêmica pode ser induzida pela detecção de outros produtos bacterianos via PRR [80]. Porém, nem anticorpos diretos contra toxinas bacterianas ou antígenos de superfície (ou ambos) nem preparações anti-citocinas podem mostrar um efeito positivo em pacientes com tempestade de citocinas durante a sepse ou choque séptico [31]. CARS pode ocorrer paralelamente à instituição da sepse como resposta compensatória, associada ao desenvolvimento de imunossupressão e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e IL-10, o que pode interferir na falta de expressão aumentada de TLRs, favorecendo a ocorrência de infecção grave [20]. Pesquisas historicamente sugerem a necessidade de modular a função das células imunológicas para melhorar a resistência em pacientes gravemente doentes [78]. Para tanto, vários estudos vem demonstrando alguns tratamentos como o uso de anticorpos para neutralizar a ação dos mediadores da resposta inflamatória como anti-TNF- α , anti-endotoxina e antagonista de IL-1; inibidores de NO e eicosanoides; hormônios do timo (timopentina) com ou sem combinação com indometacina; estimulação linfocitária da produção de IL-2; regulação da atividade dos macrófagos, o que inclui bloqueio da sua migração; remoção de endotoxinas por hemofiltração; bloqueio da atividade do sistema do complemento; e neutralização de espécies ativas de oxigênio [79,80]. Porém, conforme demonstrado por vários estudos clínicos, esses métodos não causaram uma diminuição significativa da mortalidade nestes pacientes [20].

2 JUSTIFICATIVA:

Vários estudos se concentraram na tentativa de entendimento dos efeitos do sistema imunológico inato na fisiopatologia da sepse. Estudos evidenciaram que as células NK são fundamentais na imunidade precoce contra infecções bacterianas, as quais são reconhecidas via PAMPs pelos seus receptores TLR, o que só pode ocorrer dentro de um microambiente complexo repleto de citocinas inflamatórias e outras células imunológicas ativadas. Além de mediar a citotoxicidade pela produção de várias citocinas, as células NK também possuem funções reguladoras na inflamação devido à sua capacidade de interação com outras células imunológicas, o que é crucial na determinação da resposta imunológica das células NK contra a infecção, tanto pela supressão quanto pela ampliação da inflamação. A pesquisa clínica identificou que o número de células NK circulantes na corrente sanguínea se correlaciona inversamente com a sobrevivência do paciente, com números de células NK circulantes significativamente menores em sobreviventes de sepse, o que sugere que as células NK participam da sepse e seus níveis circulantes podem ser indicador da mortalidade. Apesar dos inúmeros estudos clínicos propostos e testados no tratamento da sepse, nenhum tratamento tem demonstrado eficácia significativa na prevenção da sepse e na redução da sua elevada mortalidade. O mecanismo molecular pelo qual as células NK participam da patogênese da sepse não está totalmente elucidado, não havendo consenso se a linfopenia do sangue periférico observada na sepse poderia estar associada ao aumento dos níveis de células NK nos sítios de infecção. Como o pulmão é um dos órgãos mais frequentemente acometidos por infecção na vigência da sepse, optou-se neste estudo pesquisar se há alguma relação deste suposto “fluxo” de células NK no combate da infecção pulmonar, correlacionando-se com as concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α) e células T CD4⁺ e T CD8⁺ tanto no lavado broncoalveolar (LBA) quanto no sangue periférico. O LBA, coletado nesta pesquisa por broncoscopia flexível, representa o sistema imunológico e inflamatório do trato respiratório, o que é útil e fidedigno na determinação das populações celulares e citocinas, como pode ser melhor compreendido no Anexo 1.

3 OBJETIVOS:

3.1 Objetivo geral:

Avaliar se as células NK são encontradas no LBA de pacientes portadores de sepse pulmonar.

3.2 Objetivos específicos:

Avaliar se as células NK, uma vez presentes no LBA de pacientes portadores de sepse pulmonar, apresentam o mesmo padrão de subconjuntos celulares CD56^{dim}, CD56^{bright}, CD4⁺ e CD8⁺ encontrados no plasma destes pacientes.

Avaliar se as concentrações de mediadores pró-inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α) observadas no LBA de pacientes portadores de sepse pulmonar é comparável às do plasma destes pacientes.

Comparar os achados celulares (CD56^{dim}, CD56^{bright}, CD4⁺ e CD8⁺) e de mediadores pró-inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α) observados no LBA e no plasma de pacientes portadores de sepse pulmonar com os obtidos de indivíduos controles saudáveis.

Avaliar a presença de alterações clínicas que possam influenciar a resposta imunológica, tais como o perfil nutricional dos pacientes e as concentrações plasmáticas de vitamina D.

4 METODOS

4.1 Descrição das amostras:

Trata-se de estudo prospectivo, no qual foram analisados, após liberação pelo Núcleo de Bioética / Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (anexo 2) e da Universidade Federal do Paraná (anexo 3), pacientes denominados *Casos Clínicos* portadores de sepse pulmonar internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Cajuru e pacientes denominados *Casos Controle*, portadores de traqueostomia, em acompanhamento de rotina no Setor de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru. Os pacientes, após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 4 e 5), foram submetidos a exames de Broncoscopia na UTI (casos clínicos) e no Setor de Endoscopia Respiratória (casos controles) quando eram coletadas amostras de LBA e de sangue. O LBA foi coletado a partir de brônquios segmentares do lobo médio para os indivíduos saudáveis dos casos controles e dos brônquios segmentares dos lobos envolvidos nas infecções pulmonares para os casos clínicos. As amostras de sangue foram coletadas de veia periférica puncionada no momento do exame e acondicionadas em dois frascos diferentes nos quais eram acondicionados 3ml de sangue em tubo com heparina (tampa verde); e 3ml em tubo com EDTA (tampa rocha), num total de 6ml de amostras.

4.1.1 Critérios de inclusão:

Pacientes com até 48 horas de internação na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Cajuru portadores de sepse de origem pulmonar confirmada conforme protocolo de diagnóstico e tratamento utilizado para manejo da sepse no Serviço de Terapia Intensiva do hospital (anexo 6); e controles saudáveis do ponto de vista inflamatório e infeccioso, ou seja, sem doença pulmonar ativa no momento do exame, e portadores de traqueostomia realizada em internação prévia decorrente de necessidade de entubação orotraqueal prolongada, em acompanhamento no Setor de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru.

4.1.2 Critérios de exclusão:

Pacientes portadores de alguma patologia que afetasse seu sistema imunológico como câncer, portadores do vírus HIV, pacientes submetidos previamente a algum transplante de órgão ou tecido, usuários crônicos de corticoterapia ou outras medicações imunossupressoras.

4.2 Materiais:

4.2.1 Materiais hospitalares descartáveis:

Os materiais hospitalares utilizados nos procedimentos endoscópicos foram os mesmos utilizados rotineiramente pelo Serviço de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru, dos quais se destacavam os materiais descartáveis provenientes da farmácia do hospital: um pacote de compressas de gaze 10x10cm; duas seringas de 20ml; uma agulha 40X12Fr; uma unidade de SF 0,9% 500ml; um frasco de 20ml de Cloridrato de Lidocaína a 1% (10mg/ml); uma unidade de Cloridrato de lidocaína 2% (20mg/ml) em gel; um frasco de 20ml de Propofol (10mg/ml) e um par de luva cirúrgica estéril 8.0 (figura 4). Também foram utilizados materiais permanentes esterilizados provenientes da central de materiais do hospital: dois campos cirúrgicos, um avental cirúrgico; um pacote de compressa cirúrgica 25x23cm; e uma cuba rim.



Figura 4. Materiais para realização de broncoscopia. A) Cloridrato de lidocaína 2% (20mg/ml) em gel para lubrificação do aparelho e anestesia tópica; B) Seringas de

20ml para instilar anestésico tópico nas vias aéreas e solução salina para o LBA; C) cuba estéril para colocação da solução salina; D) compressas de gaze 10x10cm; E) tubo coletor de secreção brônquica.

4.2.2 Reagentes

Foram utilizados anticorpos marcados contra os seguintes antígenos: anti-CD3 (clone UCHT1), anti-CD56 (clone HCD56), anti-CD19 (clone HIB19), anti-CD20 (clone 2H7), anti-CD4 (clone RPA-T4), Anti-CD8 (clone SK1). Todos os anticorpos, reagente de bloco Fc (anti-CD16 / 32) e 7-AAD, utilizado como corante de viabilidade, foram adquiridos a Biolegend (San Diego, CA, EUA). As citocinas foram medidas por citometria de fluxo utilizando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Humana Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD Bioscience, San Jose, CA, EUA).

4.2.3 Equipamentos de broncoscopia:

Fibrobroncoscópio Olympus BF Type TE2 (figura 9) e fonte de luz halógena 150W Olympus CLK-4 (figura 5).



Figura 5. Fibrobroncoscópio Olympus BF Type TE2.



Figura 6. Fonte de luz halógena 150W Olympus CLK-4.

4.2.4 Equipamento de citometria:

Na citometria de fluxo foi utilizado o citômetro BD FACS Calibur™ (BD Biosciences, San José, CA, EUA), ilustrado na figura 7.



Figura 7. Aparelho de Citometria de Fluxo BD FACS Calibur™.
(<http://www.bdbiosciences.com/sg/instruments/facscalibur/index.jsp>)

4.3 Descrição dos procedimentos:

4.3.1 Lavado broncoalveolar:

O lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado no exame de broncoscopia, no Setor de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru. Para o exame o aparelho foi introduzido pelo broncoscopista posicionado em pé e por detrás da cabeça do paciente, que se encontrava em posição supina em decúbito dorsal horizontal (figura 8). Foi utilizado durante o exame sedação com Propofol (10mg/ml) a 1,5 a 2,5 mg/kg e anestesia tópica com Cloridrato de Lidocaína a 1% (10mg/ml) sem vaso constritor, com suplementação de oxigênio utilizando-se cateter nasal a 3l/min durante a realização do exame e até sua recuperação anestésica.

Para a técnica de coleta de LBA, primeiramente fez-se inspeção broncoscópica das vias aéreas seguido de aspiração de conteúdo grosseiro impactado nos brônquios como excesso de muco, secreção purulenta ou coágulos, para a identificação da anatomia das vias aéreas. Então o broncoscópio era impactado em cunha num brônquio subsegmentar de terceira ordem, seguido de injeção de cinco alíquotas de 20ml de solução salina estéril de NaCl 0,9% (até um total de 100ml) para posterior aspiração do conteúdo injetado, com pressão de aspiração entre 20 a 80mmHg, conseguida com o pressionamento parcial da válvula de sucção do aparelho. O líquido era recuperado em recipientes siliconados tipo sifão de coleta estéril conectado na sucção do aparelho (figura 9). O material recolhido (LBA e sangue periférico) era então prontamente enviado ao Laboratório de Cultivo Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná em recipiente isolante térmico de transporte.



Figura 8. Posicionamento do endoscopista. A) óptica de observação; B) válvula de sucção; C) saída de vácuo para aspiração.



Figura 9. Frasco de coleta de secreção brônquica. Aspecto da secreção coletada de lavado broncoalveolar (LBA) no frasco de coleta.

4.3.2 Isolamento das células do lavado broncoalveolar e do sangue periférico:

As amostras do lavado broncoalveolar (LBA) recebidas foram transferidas para dois tubos de 50 mL e centrifugadas a 400g por 10 minutos. Três mililitros do sobrenadante foram distribuídos em microtubos e criopreservados a -80°C para análises futuras. O restante da amostra foi homogeneizado e filtrado em *cell strainer* (Greiner, Bio-One, Americana, Brasil) com malha de 100µm para a retirada de microcoágulos. As células foram contadas em câmara de Neubauer e o número acertado para 1:10⁶ por mL para na sequência ser realizada a marcação fluorescente e a verificação da viabilidade.

As amostras de sangue periférico recebidas foram centrifugadas a 400g por 10 minutos. Três mililitros do sobrenadante (plasma) foram distribuídos em microtubos e criopreservados a -80°C para análises futuras. Foram colocados 200µL de sangue total em cada um dos tubos de citometria para na sequência ser realizada a marcação fluorescente e a verificação da viabilidade.

4.3.3 Caracterização celular por citometria de fluxo:

A caracterização, quantificação e análise da viabilidade das células foi realizada pela técnica da citometria de fluxo com anticorpos específicos. As células do LBA e do sangue foram analisadas logo após seus isolamentos, no mesmo dia da coleta. A técnica utilizada foi realizada de acordo com Owens *et al*, conforme observado na figura 10 [81].

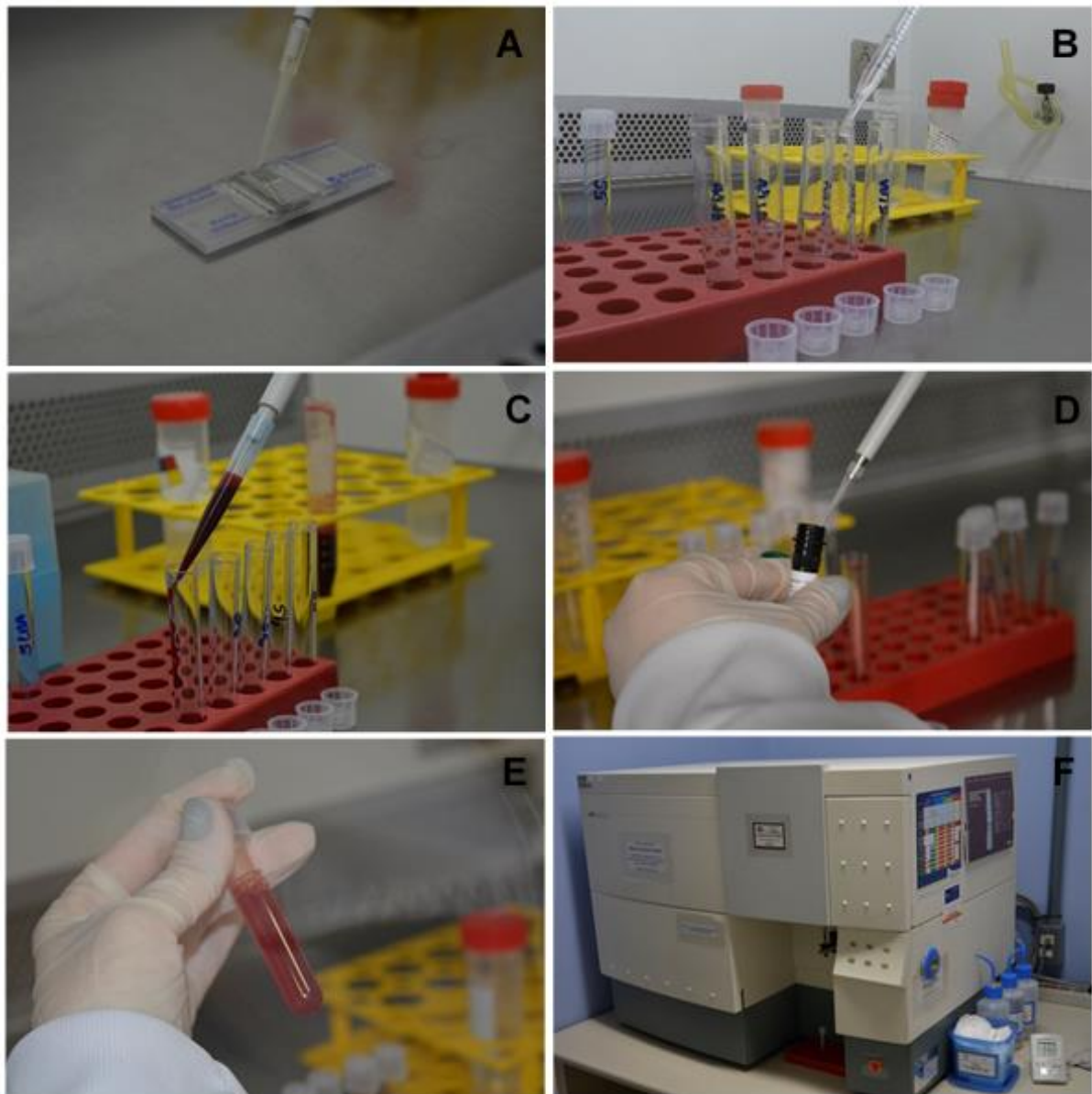


Figura 10. Marcação de antígenos intracelulares e de superfície por citometria de fluxo. Em amostras de LBA foi realizada a contagem celular (A). O LBA (B) e o sangue (C) de indivíduos controle e com sepse foram incubados com anticorpos conjugados com fluorocromos no escuro (D). As hemácias foram eliminadas com o tampão ACK (E). Os dados de citometria de fluxo foram adquiridos através do Citômetro FACS Calibur e analisados no software Flow Jo (F).

Primeiramente foi realizado o bloqueio da porção Fc nas amostras de LBA, incubando as células com 1 μ L de Human TruStain FcX-anti-CD16/32 (BioLegend, San Diego, USA) por dez minutos a temperatura ambiente. As células do LBA e do sangue foram marcadas para seus antígenos de membrana. Foram adicionados os anticorpos com diluições de acordo com o sugerido pelo fabricante. Os clones e fluorocromos

utilizados encontram-se descritos conforme a quadro 1-A. As células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, as hemácias foram lisadas com tampão de lise (ACK). Foram adicionados 500µL de PBS nos tubos que foram centrifugados a 400g por cinco minutos.

As células foram então marcadas para antígenos intracelulares. A cada tubo foram adicionados 100µL do reagente A do kit *Fix and Perm*[®] (Invitrogen, Frederick, USA) e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por 15 minutos. Foram adicionados dois mililitros de PBS nos tubos que foram centrifugados durante 5 minutos a 400g. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado o anticorpo monoclonal (quadro 1-B) mais 100µL do reagente B do kit *Fix and Perm*[®]. A amostra foi incubada à temperatura ambiente, no escuro por 20 minutos. Foram adicionados 500µL de PBS nos tubos que foram centrifugados durante 5 minutos a 400g. O sobrenadante foi desprezado e as células foram reconstituídas e fixadas em 500µL de PBS, com 2% de formaldeído (Merck[®]).

A viabilidade das diferentes amostras e populações celulares foi realizada com o corante vital 7AAD (BD-Pharmingen[®]). A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton e Dickinson[®]), o qual permite analisar até seis parâmetros por amostra. Foram coletados 500.000 eventos de cada amostra. O ajuste do equipamento foi realizado para as condições de análise de tamanho e fluorescência das células. O ajuste para os parâmetros de fluorescência foi realizado por meio da incubação das células com o controle isotópico (quadro 1-C). A redução da interferência entre os fluoróforos nos diferentes canais de fluorescência foi realizada por compensação.

As análises de células NK e células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram realizadas por citometria de fluxo no Laboratório de Cultivo Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná logo após o preparo das amostras recebidas. Os antígenos de superfície celular foram marcados por diluição de anticorpos em tampão de coloração à concentração sugerida pelos fabricantes. As amostras foram processadas conforme protocolo descrito acima e protocolo do estudo (anexo 7) e os dados adquiridos pela citometria de fluxo foram analisados utilizando o *software* Flow Jo[®] (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

Quadro 1. Conjunto de Anticorpos Utilizados

	Marcador	Fluorocromo	Clone	Catálogo	Fabricante
A	Anti-human CD3	FITC	UCHT1	300406	BioLegend
	Anti-human CD3	APC	UCHT1	300412	BioLegend
	Anti-human CD4	FITC	RPA-T4	300506	BioLegend
	Anti-human CD8	PE	SK1	344706	BioLegend
	Anti-human CD19	FITC	HIB19	302206	BioLegend
	Anti-human CD20	PE	2H7	302306	BioLegend
	Anti-human CD56	PE	HCD56	318306	BioLegend
B	Anti-human Perforin	APC	dG9	308111	BioLegend
C	Mouse IgG2a, κ isotype Ctrl	APC	MOPC-173	400220	BioLegend
	7-AAD Viability Staining Solution	-	-	420403	BioLegend

IgG2a (Imunoglobulina 2a); Ctrl: Controle (do inglês: *Control*); CD: *Grupos de Diferenciação* (do inglês, *Cluster of Differentiation*); 7-AAD: 7-Amino-Actinomicina D; APC: Conjugado de Alofococianina (do inglês: *Allophycocyanin*); FITC: Conjugado de Isotiocianato de Fluoresceína (do inglês: *Fluorescein isothiocyanate*); PE: Conjugado de Ficoeritrina (do inglês: *Phycoerythrin*).

4.3.4 Determinação de citocinas citometria de fluxo:

As dosagens das citocinas foi realizada no Hospital da Mulher - Prof. Dr. José Aristodemo Pinottill - CAISM, UNICAMP no soro e sobrenadante congelado de plasma e LBA, respectivamente, das amostras de pacientes com sepse e de controle saudáveis. Foi utilizada a técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) após estimulação das amostras com fitohemaglutinina (PHA 2,5µg/ml; Gibco BRL, NY, USA) por 24 horas seguido de coloração com anticorpos à concentração sugerida pelos fabricantes com o kit de anticorpos específicos *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II* (BD, San Jose, CA, USA), em que o soro e o sobrenadante foram incubados e expostos aos anticorpos específicos às respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE), sendo então acrescentado 1ml de solução de lavagem seguido de centrifugação por dez minutos a 1100rpm cujo sobrenadante fora desprezado e a as amostras novamente suspensas para as

aquisições no citômetro de fluxo BD FACS Calibur™ (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Os resultados foram gerados e tabulados seguido de análises pelo *software* FCAP Array^R (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

4.3.5 Análise estatística:

A análise estatística foi realizada utilizando o Graph Pad Prism Software (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Considerou-se que os dados eram estatisticamente significativos quando o valor de *p* era igual ou inferior a 0,05. Os testes estatísticos utilizados foram o teste de Mann Whitney, ou ANOVA unidirecional com o teste *post hoc* de Tukey para a comparação de grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Epidemiologia da amostra:

Foram estudados vinte e três pacientes portadores de sepse grave e com evidência de infecção primária nos pulmões, com média de idade de 59,17 anos (variando de 32 a 86 anos), dos quais 16 pacientes (69,57%) eram homens e 7 (30,43%) eram mulheres. As características clínicas dos pacientes são descritas e resumidas na tabela 3, na qual se observa 14 pacientes (60,86%) possuíam alguma comorbidade associada, num índice de mortalidade de 30,43%. Todos os pacientes com sepse foram submetidos à ventilação mecânica e a maioria apresentava evidência de infecção primária nos pulmões, pois 19 (82,61%) tiveram infecção confirmada pela cultura do aspirado traqueal. Dezenove pacientes (82,61%) apresentaram alguma alteração radiológica suspeita de acometimento pulmonar. Quinze pacientes (62,21%) apresentaram infecções bacterianas Gram-negativas; dois (8,69%) apresentaram infecções bacterianas Gram-positivas; três (13,04%), tiveram infecções fúngicas; e três (13,04%) apresentaram infecções microbianas indeterminadas, ou seja, não apresentaram positividade nas culturas de secreções coletadas. Como observado na tabela 4, em relação aos germes identificados pelos resultados de cultura do LBA, verificou-se que *Acinetobacter baumannii* foi identificado em 5 pacientes (21,74%); *Klebsiella pneumoniae*, em 3 (13,04%); *Pseudomonas aeruginosa*, em 3 (13,04%); *Staphylococcus aureus* em 2 (8,7%); outros (*Candida tropicalis*, *Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter aerogenes*), em 4 (17,39%); e a cultura foi negativa em 4 (17,39%). Dos dez controles saudáveis, 8 (80%) eram homens e 2 (20%) eram mulheres, com média de idade de 49,4 anos (variando de 17 a 81 anos), sendo que todos os pacientes eram portadores de traqueostomia realizada em internação prévia decorrente de necessidade de intubação orotraqueal prolongada devido a um evento agudo como trauma crânio encefálico ou poli traumatismo. Porém nenhum dos controles apresentava doença pulmonar ativa no momento da coleta das amostras e eram considerados clinicamente estáveis e, embora os controles ditos saudáveis tenham sido submetidos a amostragem de sangue periférico e LBA, a maioria dos parâmetros clínicos exibidos para os pacientes não eram aplicáveis a esses controles.

Tabela 3. Parâmetros clínicos dos pacientes portadores de sepse pulmonar e casos controle.

Parâmetros	Controle (n = 10)	Pacientes (n = 23)
Idade	49.4 (22.6)	59.17 (17.02)
Masculino	8 (80%)	16 (69.57%)
Feminino	2 (20%)	7 (30.43%)
IMC (Kg/m ²)	28.13 (2.48)	26.14 (4.61)
Comorbidades, n (%)	N/A	14 (60.86%)
Acidente cerebrovascular hemorrágico	N/A	4 (17.39%)
DPOC	N/A	1 (4.35%)
Câncer	N/A	1 (4.35%)
Pulmão	N/A	4 (17.39%)
Falência renal	N/A	1 (4.35%)
Trauma raquimedular	N/A	4 (17.39%)
Politrauma	6 (60%)	4 (17.39%)
Ventilação mecânica	N/A	23 (100%)
<i>Sítio de infecção</i>		
Trato urinário	N/A	10 (43.48%)
Aspirado traqueal	N/A	19 (82.61%)
Ventilação mecânica	N/A	23 (100%)
Leucócitos (%/mm ³)	N/A	15059.56 (10424.43)
SOFA	N/A	5.43 (2.27)
APACHE II	N/A	21 (9.95)
Tempo de internação hospitalar (dias)	N/A	39.82 (21.21)
Tempo de permanência na UTI (dias)	N/A	18.78 (9.96)
Mortalidade (%)	N/A	7 (30.43%)
Bactérias Gram positivas (%)	N/A	2 (8.69%)

Bactérias Gram negativas (%)	N/A	15 (65.21%)
Fungos (%)	N/A	3 (13.04%)
Germe indeterminado (%)	N/A	3 (13.04%)

IMC: índice de massa corpórea; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; N/A: não se aplica; SOFA: sequential organ failure assessment; SAPS: simplified acute physiology score.

Tabela 4. Resultado de culturas solicitadas a partir do lavado broncoalveolar (LBA).

Cultura de LBA	Pacientes (N=23)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5 (21,74%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPC)	3 (13,04%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3 (13,04%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (8,7%)
Outros*	5 (21,74%)
Negativo	4 (17,39%)

* Outros: *Candida tropicalis*, *Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter aerogenes*.

Em relação ao perfil laboratorial e metabólico dos pacientes portadores de sepse (tabela 5), observou-se notável presença de carência de vitamina D, pois apenas um paciente (4,35%) apresentou concentração de suficiência da vitamina (30,0 a 100,0ng/ml), enquanto 20 (86,96%), apresentaram deficiência (inferior a 20,9ng/ml); e 2 (8,7%), apresentaram insuficiência (21,0 a 29,9ng/ml), como visto no gráfico 1. Quanto à concentração plasmática de albumina, destacado no gráfico 2, todos os pacientes apresentaram algum grau de hipoalbuminemia, ou seja, albumina plasmática inferior a 3,5g/dL (normal entre 3,5 a 5g/dL), sendo a severa (<2,5g/dL) observada em 12 pacientes (52,17%); moderada (2,5 a 3,0g/dL), em 9 (39,13%); e leve (3,0 a 3,5g/dL), em 1 (4,35%). Conforme destacado no gráfico 3, proteína C reativa (PCR) esteve elevada em todos os pacientes, variando de 3,3 a 26,7mg/L (normal 1mg/L), indicando o grau inflamatório sistêmico consequente do quadro de sepse.

Tabela 5. Perfil clínico e laboratorial dos pacientes portadores de sepse.

N	Leucócitos (%/mm³)	Bastonetes (%/mm³)	Linfócitos (%/mm³)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)	Lactato (mg/dL)
1	11600	580	1740	1,6	187	1,1
2	13190	1582,8	2110,4	0,69	83	1,1
3	10630	2019,7	744,1	0,24	69	1,1
4	10300	1957	2163	1,63	243	1,2
5	18200	2912	1274	0,21	42	1,3
6	5820	465,6	640,2	0,58	43	0,5
7	14780	886,8	2808,2	0,34	35	0,9
8	11230	786,1	1123	0,21	35	0,8
9	17040	3748,8	1192,8	0,79	47	0,7
10	13520	1487,2	946,4	1,92	53	0,5
11	5930	29057	4151	0,39	56	1,8
12	17380	2780,8	1042,8	0,25	46	1,1
13	13300	3325	1330	0,89	57	0,6
14	14080	704	2112	0,77	21	0,8
15	15880	2540,8	1746,8	0,34	51	1
16	9260	2129,8	648,2	0,05	49	1,2
17	6290	377,4	691,9	3,61	148	0,8
18	23310	3263,4	1864,8	0,38	75	1,1
19	13050	2349	1827	0,49	18	0,7
20	11890	832,3	1189	1,02	98	1
21	15110	1208,8	1359,9	0,14	74	1,9
22	7690	922,8	615,2	0,33	81	1,1
23	13520	1487,2	1622,4	0,2	46	0,6

Tabela 5. Perfil clínico e laboratorial dos pacientes portadores de sepse.
(continuação).

N	25(OH)D	Albumina	Ventilação		PCR
	(ng/mL)	(mU/L)	Traqueostomia	Mecânica	(mg/dL)
1	20,6	2,8	Sim	Sim	20,5
2	11,6	1,9	Sim	Sim	17,7
3	19,5	1,7	Sim	Sim	21,9
4	14,1	1,7	Não	Sim	19,7
5	9,4	2,6	Sim	Sim	27
6	16,2	2,6	Sim	Sim	20,4
7	19,1	3	Sim	Sim	14,7
8	29,1	2,2	Não	Sim	3,3
9	-	2,7	Sim	Sim	24,6
10	7,9	2,6	Sim	Sim	17,7
11	10,5	2,3	Sim	Sim	27
12	17,1	2,2	Sim	Sim	15
13	32,1	3	Sim	Sim	26,7
14	8,6	3,1	Sim	Sim	27
15	20,4	2,5	Sim	Sim	21
16	5,6	2	Sim	Sim	27
17	12	2,5	Sim	Sim	9,1
18	13,6	1,8	Sim	Sim	18,4
19	-	2,1	Não	Sim	23,2
20	19,2	2,3	Sim	Sim	27
21	7,2	2,1	Sim	Sim	5,1
22	5,6	1,8	Sim	Sim	9
23	24,1	2,9	Sim	Sim	6,1

25(OH)D (vitamina D3), PCR (proteína C reativa)

Tabela 5. Perfil clínico e laboratorial dos pacientes portadores de sepse. (continuação).

N	Tempo de					
	Sexo	Idade (anos)	SOFA	APACHE II	internação (dias)	Óbito
1	M	70	10	8	57	Não
2	M	73	3	35	26	Não
3	F	80	9	39	14	Sim
4	M	45	9	23	16	Sim
5	M	67	4	26	50	Não
6	M	64	7	24	21	Sim
7	F	58	3	13	25	Não
8	F	36	5	13	74	Não
9	M	53	4	16	19	Não
10	M	52	5	20	28	Sim
11	F	76	5	16	83	Não
12	M	69	5	30	58	Não
13	M	25	4	23	61	Não
14	M	37	4	17	65	Não
15	F	68	8	29	53	Não
16	M	60	6	30	40	Sim
17	M	61	6	33	15	Sim
18	M	66	4	9	32	Não
19	M	36	1	8	28	Não
20	M	65	5	8	61	Não
21	F	82	9	32	15	Sim
22	M	86	5	26	52	Não
23	F	32	4	5	23	Não

APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation), SOFA (Sequential Organ Failure Assessment), DI (dias de internação), UTI (Unidade de Terapia Intensiva), TSH (hormônio estimulante da tireoide), PCR (proteína C reativa).

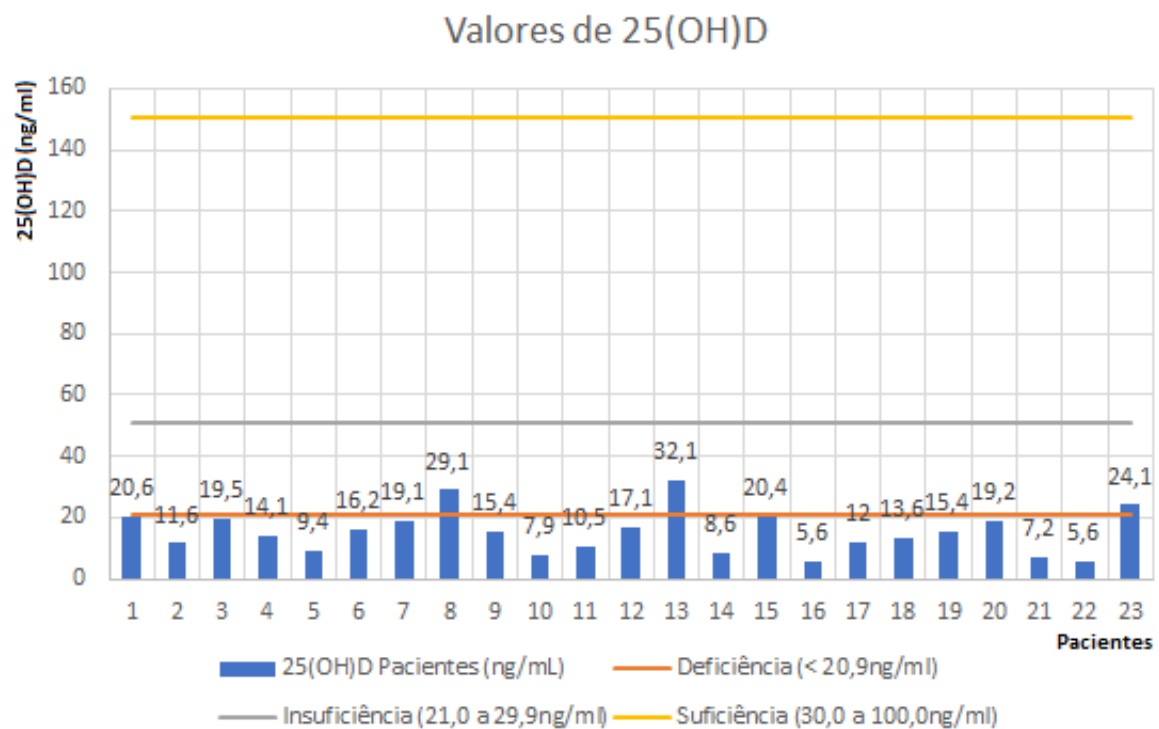


Gráfico 1. Relação da concentração plasmática de Vitamina D [25(OH)D] nos pacientes portadores de sepse pulmonar.

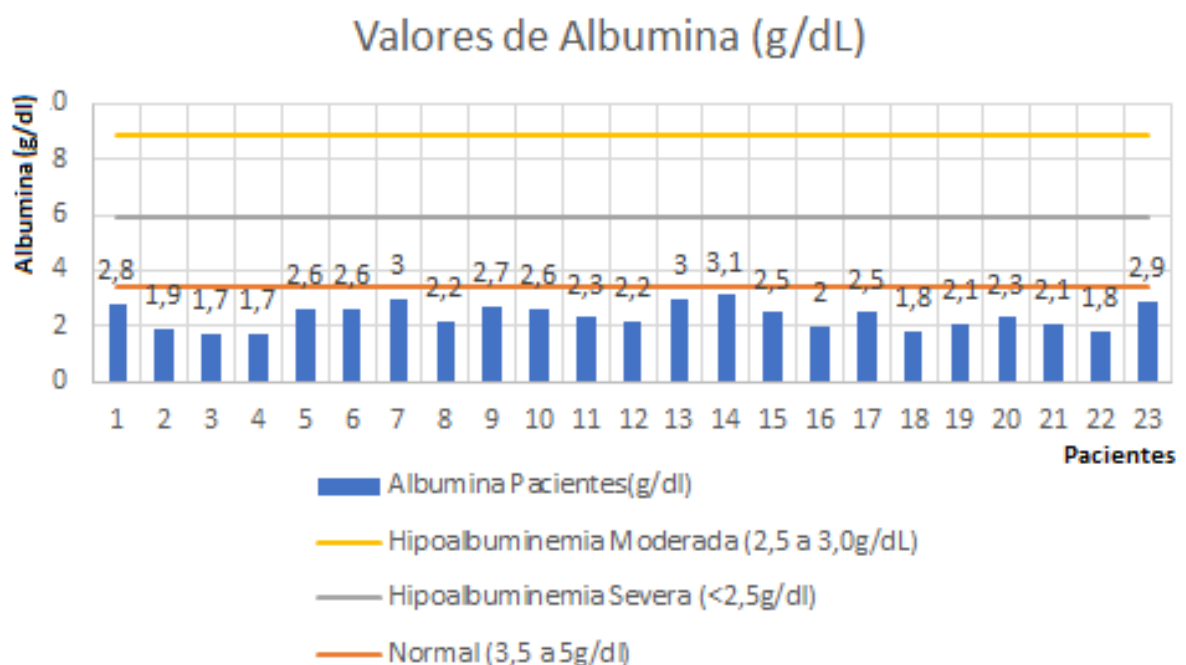


Gráfico 2. Relação da concentração plasmática de albumina nos pacientes portadores de sepse.

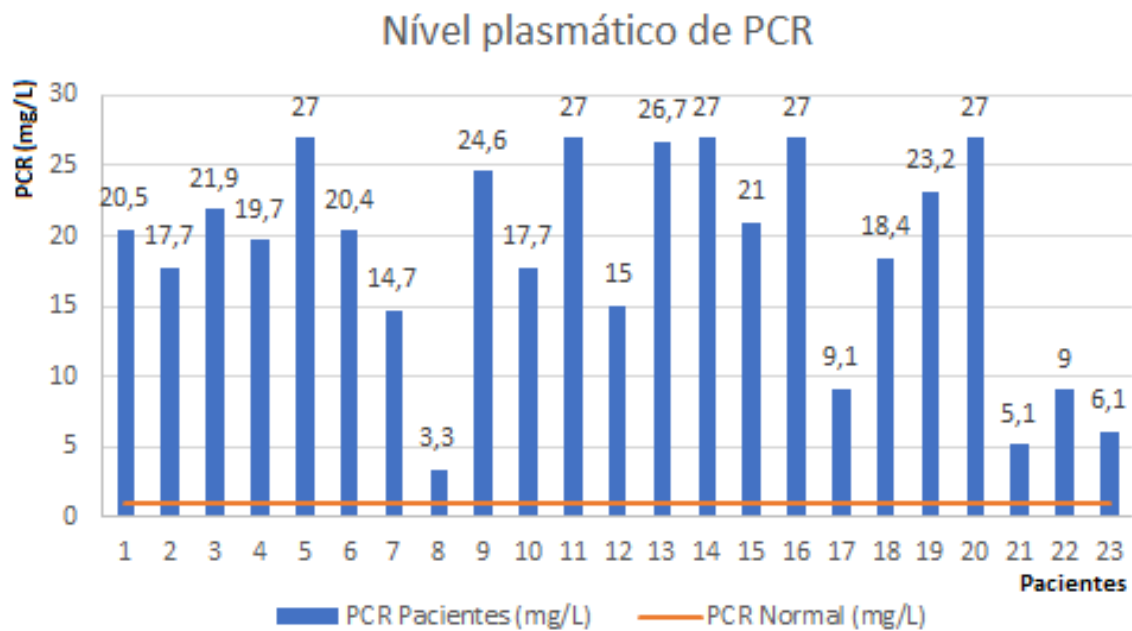


Gráfico 3. Relação da concentração plasmática de Proteína C Reativa (PCR) nos pacientes portadores de sepse.

5.2 Concentrações das citocinas pró-inflamatórias em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse:

As concentrações plasmáticas e do LBA de citocinas pró-inflamatórias foram determinados por citometria de fluxo pelo método *cytometric bead array* CBA. Como visto na figura 11, observou-se que as concentrações de IL-6 foram significativamente aumentadas tanto nas amostras de plasma dos pacientes portadores de sepse, quanto nas amostras de LBA, enquanto as concentrações de IL-2 e IL-4 foram mínimas ou até mesmo insignificantes (figura 12). Em contraste, não foi observado nas amostras de LBA e plasma aumento significativo em outras citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α (figura 13).

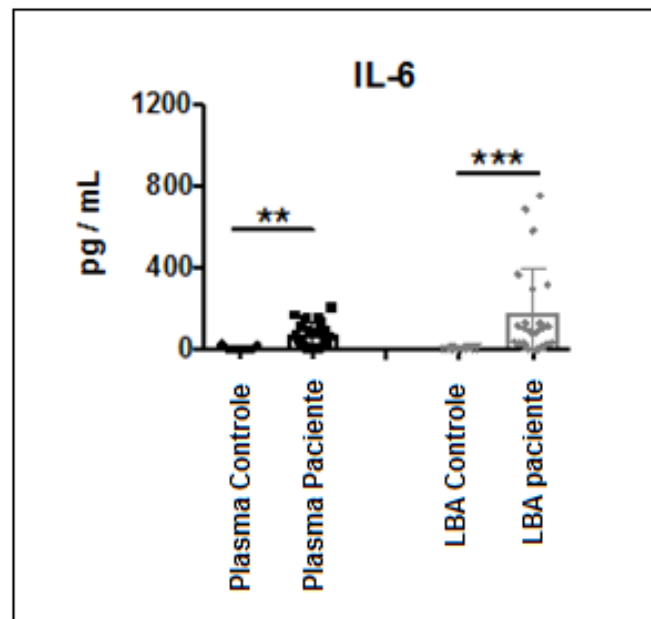


Figura 11. Concentrações de interleucina 6 (IL-6) do plasma e LBA a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse. Análise estatística realizada utilizando o teste de Mann-Whitney, onde ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ foram considerados para significância estatística.

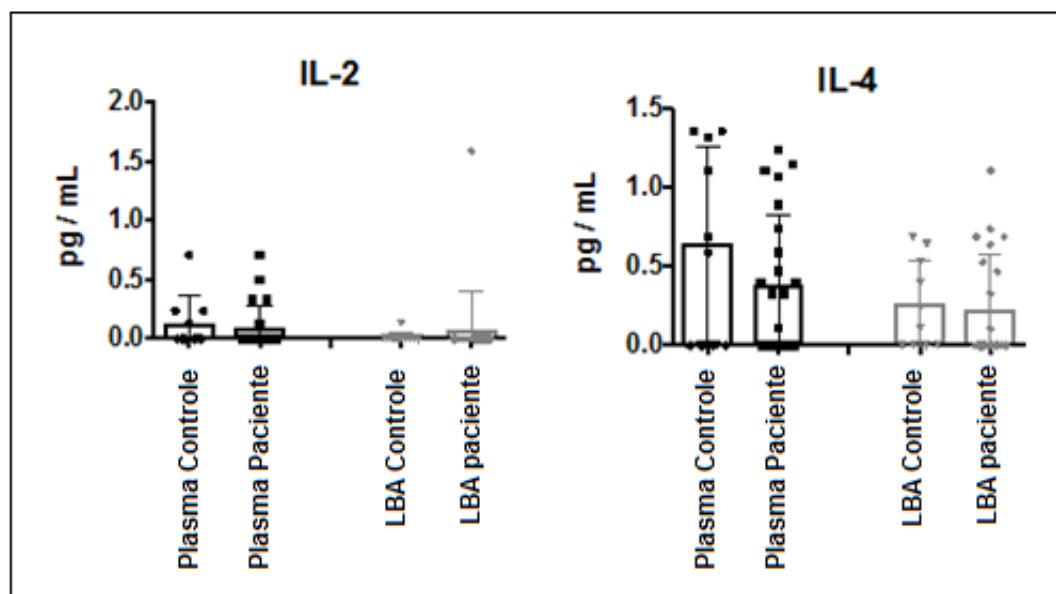


Figura 12. Concentrações de interleucina 2 e 4 (IL-2 e IL-4) do plasma e LBA a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse.

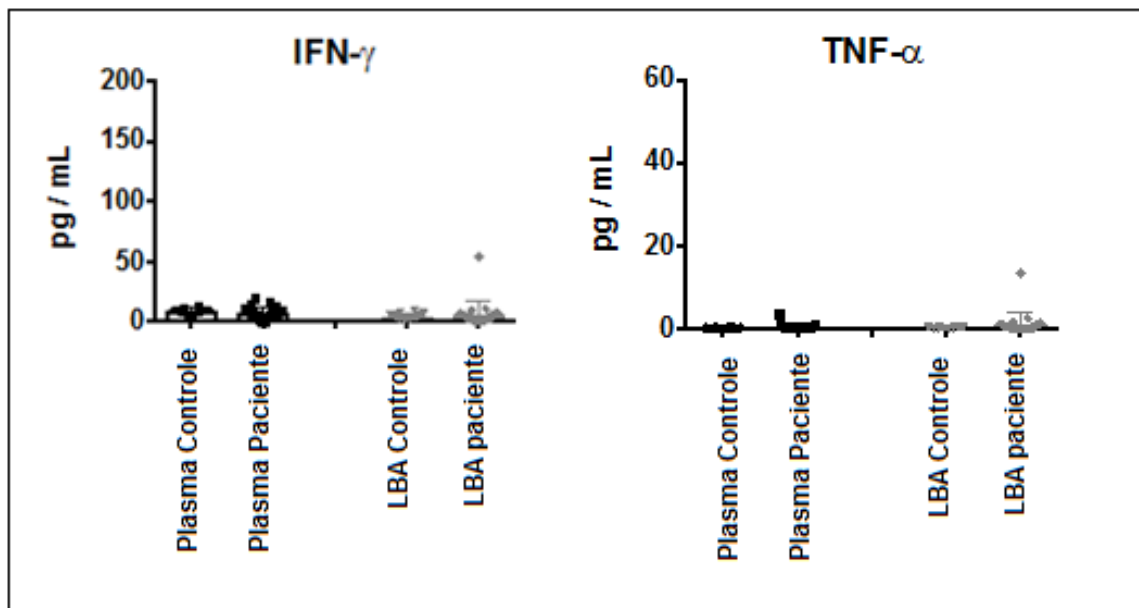


Figura 13. Concentrações de interferon gama (IFN- γ) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) em pacientes com sepse.

5.3 Subconjuntos das células NK (CD3⁻, CD56^{bright} e CD56^{dim}) em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse:

Na avaliação da composição linfocitária das amostras de plasma e LBA foram determinados e comparados os subconjuntos de células NK CD3⁻, CD56^{bright} e CD56^{dim} entre as amostras coletadas dos pacientes e dos casos controle. Os resultados de citometria de fluxo representativos de cada subgrupo são mostrados na figura 14. As comparações medianas e de traçados de cada grupo são mostradas na figura 15 para as células NK CD56^{bright} e na figura 16 para as células NK CD56^{dim}. Observou-se que os subconjuntos de células NK foram claramente reduzidos em número nas amostras de plasma de pacientes com sepse, em comparação com os controles saudáveis, não havendo diferenças significativas nos níveis celulares observados nas amostras LBA.

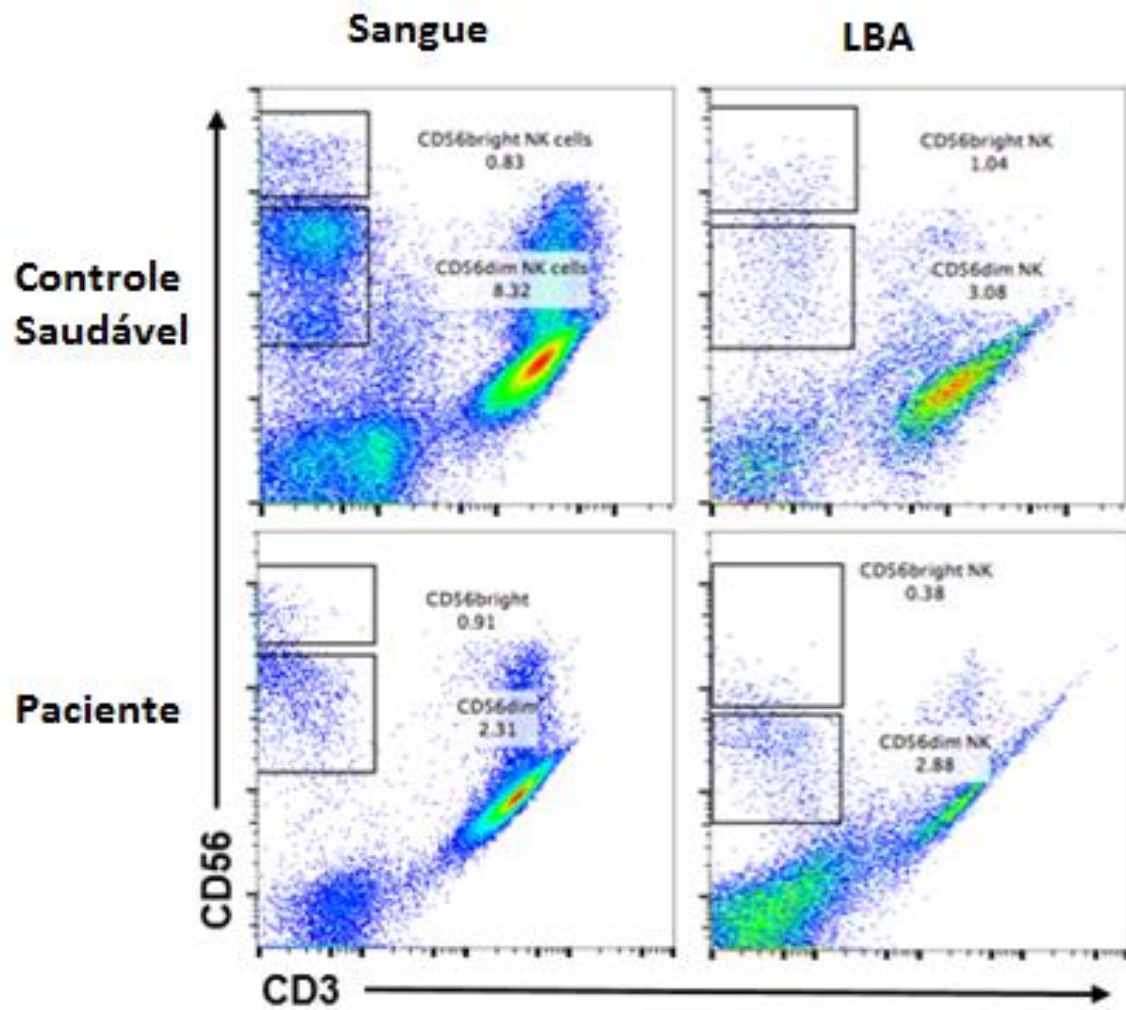


Figura 14. Representação dos subconjuntos de células NK CD3^{neg}, CD56^{bright} e CD56^{dim} por citometria de fluxo, obtida de amostras de sangue e de LBA de pacientes portadores de sepse e de controles saudáveis.

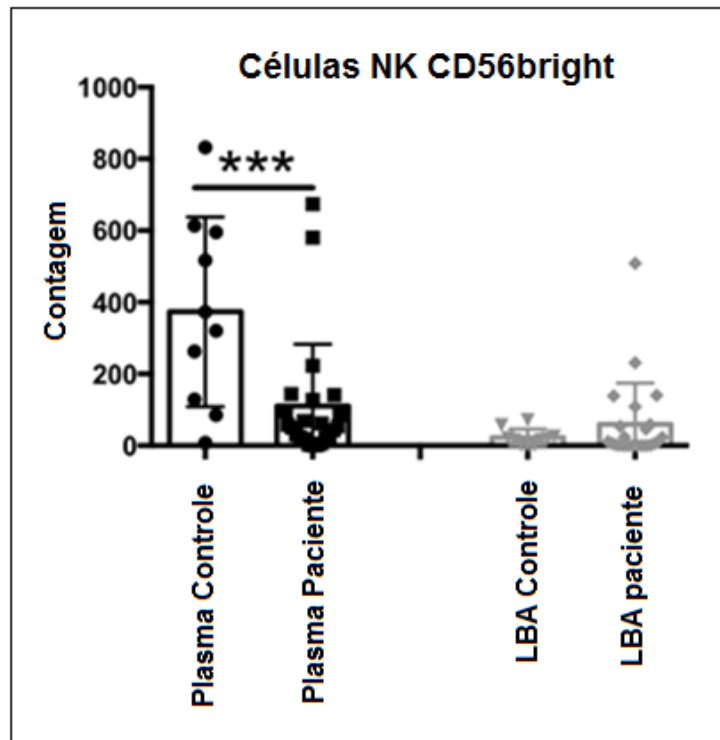


Figura 15. Subconjunto de células *Natural killer* (NK). Obtidos de amostras de plasma e lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com sepse. Observa-se na amostra de plasma o número de células NK CD56^{bright} por ml de sangue, enquanto no LBA o número de células recuperadas.

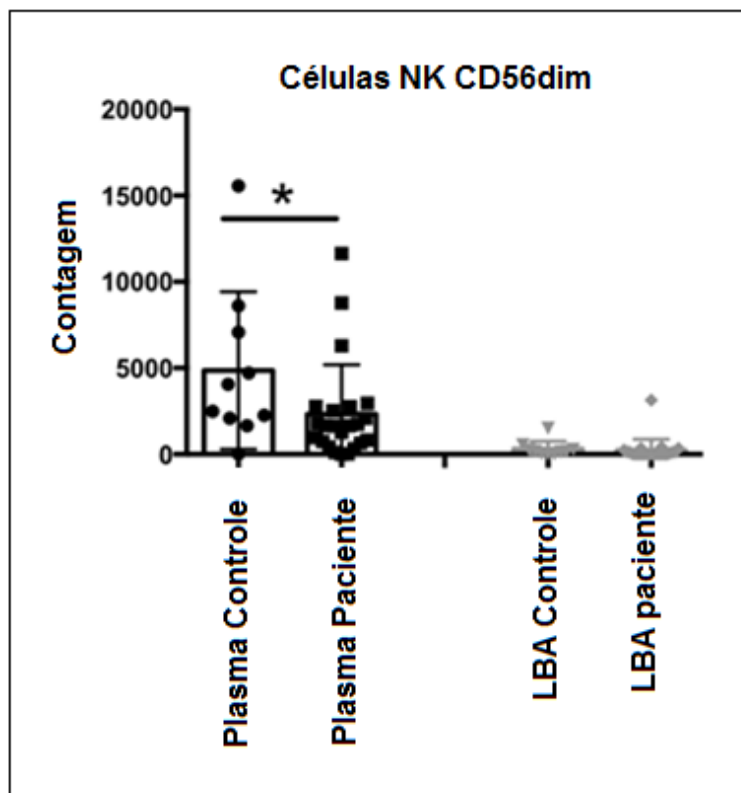


Figura 16. Subconjunto de células *Natural Killer* (NK) CD 56^{dim} obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse. Observa-se na amostra de plasma o número de células NK CD56^{dim} por ml de sangue, enquanto no LBA o número de células recuperadas. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguido do teste *post hoc* de Tukey, onde * $p < 0,05$ foi considerado para significância estatística.

5.4 Concentração das células T CD4⁺ e T CD8⁺ em amostras de LBA e plasma em pacientes portadores de sepse:

Na avaliação da composição linfocitária das amostras de plasma e LBA foram determinados e comparados os subconjuntos de células NK CD4⁺ e CD8⁺ entre as amostras coletadas dos pacientes e dos casos controle. Os resultados de citometria de fluxo representativos de cada subgrupo são mostrados na figura 17. Em consonância à redução da concentração de células NK observada no plasma de pacientes portadores de sepse, também se observou redução de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (figura 18 e 19). No entanto, as concentrações observadas no LBA também permaneceram inalterados para esses subconjuntos de células.

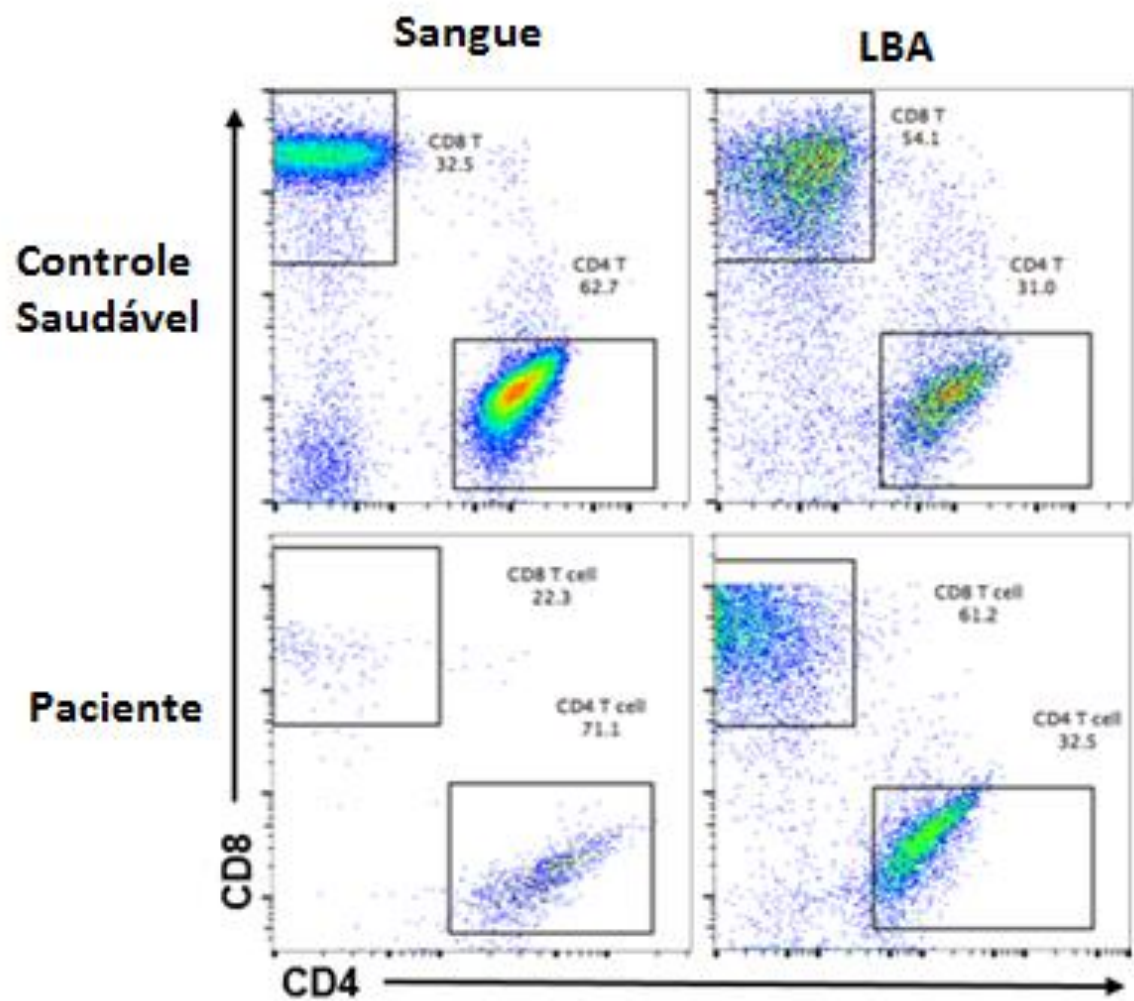


Figura 17. Representação dos subconjuntos de células NK CD4⁺ e CD8⁺ por citometria de fluxo. Obtida de amostras de sangue e de LBA de pacientes portadores de sepse e de controles saudáveis.

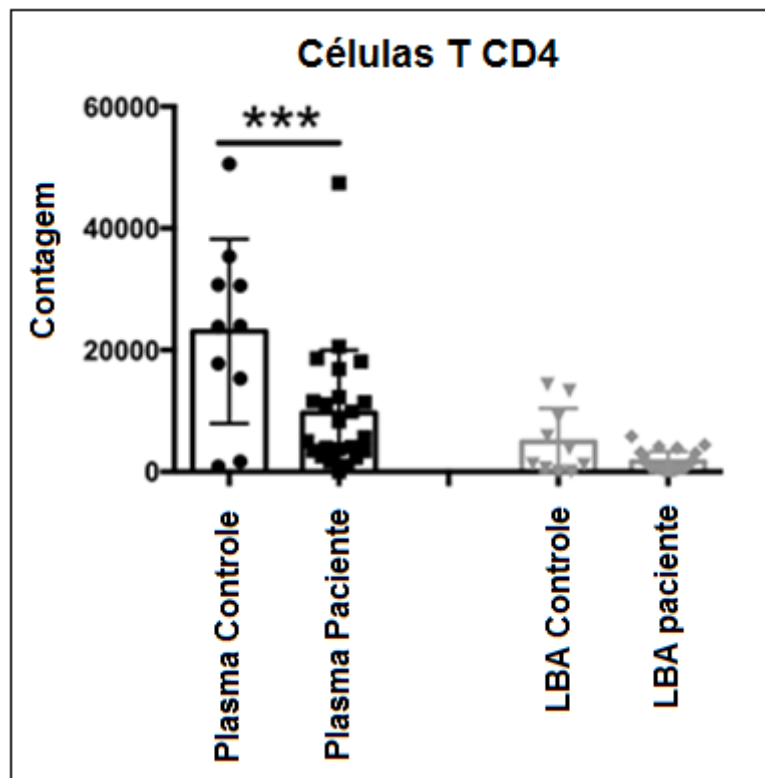


Figura 18. Subconjunto de células T CD4⁺, obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse. Observa-se na amostra de plasma o número de células CD4⁺ por ml de sangue, enquanto no LBA o número de células recuperadas. Houve redução no número de células T CD4⁺ no plasma enquanto os observados no LBA permaneceram inalterado. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguido do teste *post hoc* de Tukey, onde *** $p < 0,001$ foi considerado para significância estatística.

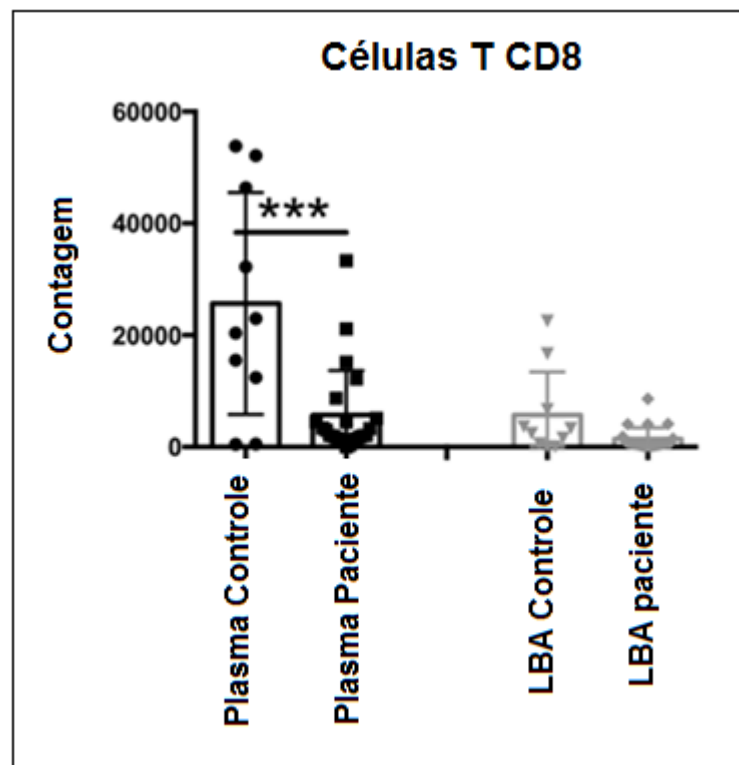


Figura 19. Subconjunto de células T CD8⁺, obtido a partir de amostras de plasma e LBA de pacientes com sepse. Observa-se na amostra de plasma o número de células CD8⁺ por ml de sangue, enquanto no LBA o número de células recuperadas. Houve redução no número de células T CD8⁺ no plasma enquanto os números observados no LBA permaneceram inalterados. A análise estatística foi realizada por ANOVA unidirecional seguido do teste *post hoc* de Tukey, onde *** $p < 0,001$ foi considerado para significância estatística.

6 DISCUSSÃO:

Foram estudados vinte e três pacientes portadores de sepse grave decorrente de infecção pulmonar, com média de idade de 59 anos, dos quais a maioria eram homens (69,57%), o que condiz com a literatura, que demonstra que a idade mediana dos pacientes afetados na sepse é de 65,2 anos, dos quais cerca de 58,7% são homens [11,12]. Observou-se que 14 pacientes (60,86%) possuíam alguma comorbidades associada, num índice de mortalidade de 30,43%. Embora diferentes comorbidades são frequentemente atribuídas aos pacientes portadores de sepse, seus maus resultados e a evolução para óbito estão geralmente relacionados com as complicações da sepse, o que torna difícil gerar de forma confiável dados epidemiológicos de arquivos hospitalares disponíveis [31]. Pacientes idosos portadores de múltiplas comorbidades e pacientes cirúrgicos politraumatizados são suscetíveis a infecções nosocomiais secundárias responsáveis por sua morte, o que ocorre de forma mais intensa e rápida quando está presente um quadro inflamatório grave, como o observado na SIRS [6]. A sepse possui elevada taxa de mortalidade e morbidade, com altos custos hospitalares, representa a principal causa de internamentos em leitos de UTI e, apesar de todos os esforços no seu tratamento clínico, representa a principal causa de óbito em pacientes críticos [6,7]. Com um índice de mortalidade de 30 a 50%, a maioria dos pacientes com sepse são admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI) e precisam de ventilação mecânica. A causa mais frequente de morte em pacientes com sepse é a disfunção orgânica, sendo o sistema respiratório responsável por 28,4% dos casos de óbito, seguido pelo cardiovascular (25,3%) e renal (23,1%) [14].

Todos os pacientes do estudo foram submetidos à ventilação mecânica em algum momento do seu manejo clínico, dos quais 19 (82,61%) tiveram infecção pulmonar confirmada, sendo que 15 (62,21%) apresentaram infecções bacterianas Gram-negativas; dois (8,69%), infecções bacterianas Gram-positivas; três (13,04%), infecções fúngicas; e três (13,04%), infecções microbianas indeterminadas, ou seja, não apresentaram positividade nas culturas de secreções coletadas (aspirado traqueal, secreção de feridas, LBA, etc.). Porém, quando se analisou a positividade de culturas obtidas exclusivamente pelo LBA verificou-se que *Acinetobacter*

baumannii foi identificado em 5 pacientes (21,74%); *Klebsiella pneumoniae*, em 3 (13,04%); *Pseudomonas aeruginosa*, em 3 (13,04%); *Staphylococcus aureus* em 2 (8,7%); outros (*Candida tropicalis*, *Serratia liquefaciens*, *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter aerogenes*), em 4 (17,39%); e a cultura foi negativa em 4 (17,39%). Os agentes patogênicos mais comuns observados na sepse e que causam choque séptico são bactérias gram-negativas, gram-positivas e micro-organismos bacterianos mistos, sendo que nos pacientes críticos graves há um maior risco de infecções por patógenos atípicos e/ou multirresistentes, tais como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina [15].

A infecção que origina o processo inflamatório sistêmico observado na sepse pode instalar-se em pacientes que apresentam alguma deficiência nos seus mecanismos inatos de defesa imunológica, o que pode ser observado em indivíduos deficientes / insuficientes de vitamina D (VD). Com a análise dos dados laboratoriais dos pacientes do estudo verificou-se a elevada prevalência de carência de VD, pois 20 pacientes (86,96%), apresentaram deficiência da vitamina; 2 (8,7%), insuficiência e apenas um (4,35%) tinha concentrações suficientes. Como pacientes críticos tem menores concentrações de VD do que pessoas saudáveis, propõem-se que concentrações adequadas de VD podem desempenhar um papel protetor importante nestes pacientes, ainda que concentrações reduzidas de VD observados na sepse podem decorrer do maior catabolismo proteico, com redução das concentrações da proteína de ligação da vitamina D (VDBP), relacionado com sepse precoce e de pior prognóstico [72]. Por outro lado, pacientes críticos possuem menor exposição à luz solar e ausência de suplementação alimentar adequada, como também há variações anuais nas concentrações plasmáticas, sendo máximas no outono e menores após o inverno, observando-se menor taxa de letalidade por sepse no verão [64]. Foi observado que a deficiência prévia à admissão hospitalar de VD relaciona-se com maior mortalidade e maior positividade de hemoculturas em pacientes críticos, mesmo após ajustes de comorbidades relevantes, sendo um preditor significativo e independente de sepse, com o risco de mortalidade 1,9 vezes maior nos indivíduos deficientes [62,65]. Em pacientes graves a deficiência pode causar um efeito aditivo nos resultados com maior tempo de internação; aumento dos custos hospitalares; piora de prognóstico; predisposição às infecções por *Staphylococcus aureus* e

Clostridium difficile; e aumento da mortalidade [66]. A relação causal não é conhecida, mas sabe-se que há aumento de interleucinas pró-inflamatórias, com efeitos adversos sobre o estresse oxidativo e aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial, importantes na patogênese da sepse, pois a VD possui efeitos antiproliferativos das células T pela alteração no RNAm, inibindo a proliferação de células Th1 / Th17 com redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-17) com desvio da produção de citocinas do fenótipo Th2 e aumento das citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) [66,68,69]. A VD impede a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a capacidade antibacteriana dos macrófagos, potencializando a expressão dos receptores TLR (*toll like receptors*) e suas respostas antibacterianas, com a produção dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) catelicidina e β -defensinas, importantes na resposta imunológica inata do trato respiratório na defesa contra infecções [62,63,64]. Porém, pacientes sépticos apresentam deficiência da VD em até 96,15% dos casos, com menor concentração plasmática durante os momentos de pico de infecção e consequente redução destes efeitos no sistema imunológico, com comprometimento da produção dos PAM, o que pode influenciar diretamente o prognóstico e a morbimortalidade destes pacientes [65,66]. Notou-se que após pré-tratamento com VD, há redução da produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-8) induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) e inibição da ativação da via de NF- κ β , sugerindo que, devido as múltiplas funções da VD no sistema imunológico em resposta à infecção, sua suplementação pode ser um componente integral no combate à sepse [67,68,69].

O perfil nutricional dos pacientes portadores de sepse é fator extremamente importante e possui relações diretas com a taxa de morbimortalidade. Muitas vezes o paciente, ao ser internado, já se encontra desnutrido e, como o processo de desnutrição é contínuo, o quadro de desnutrição pode se agravar ou, caso não apresente no momento da internação, pode adquirir a desnutrição com o decorrer do seu tratamento. Avaliando-se as concentrações plasmáticas da albumina (normal entre 3,5 a 5g/dL) dos pacientes, observou-se que todos apresentaram algum grau de deficiência, sendo a severa (<2,5g/dL) observada em 12 (52,17%); moderada (2,5 a 3,0g/dL), em 9 (39,13%); e leve (3,0 a 3,5g/dL), em 1 (4,35%). A dosagem plasmática de albumina, é frequentemente utilizada como marcador nutricional dos pacientes hospitalizados, pois representa 50 a 60% das proteínas plasmáticas e suas

concentrações reduzidas podem estar relacionadas com a desnutrição clínica e maior morbimortalidade. No Brasil, há prevalência média de 48,1% de desnutrição hospitalar, sendo que nos pacientes críticos em UTI, o quadro se agrava e pode chegar a 100% [70]. Por isso medidas e condutas de triagem e terapia nutricionais adequadas são extremamente importantes, principalmente em pacientes críticos portadores de sepse que, devido ao seu quadro catabólico intenso, há necessidade de preservação de tecido muscular e, conseqüentemente, das funções orgânicas para o paciente ter condições clínicas, nutricionais e imunológicas de combate às infecções sistêmicas. Porém, como a albumina tem sua síntese hepática reduzida em quadros inflamatórios de pacientes portadores de sepse, ou seja, trata-se de proteína de fase aguda negativa, o que também pode justificar ou potencializar sua correlação com as taxas de morbimortalidade observadas na sua deficiência, o uso isolado da concentração plasmática de albumina como marcador de desnutrição nestes pacientes pode não ser adequado [71,72]. A contagem total de linfócitos (CTL) ou linfometria é utilizada para avaliar a competência imunológica e está relacionada com o perfil nutricional dos pacientes, possibilitando dar uma estimativa das reservas imunológicas momentâneas e as condições do mecanismo de defesa celular orgânica, sendo considerada depleção leve, quando o número de linfócitos está entre 1200 a 2000/mm³; moderada, 800 a 1199/mm³; e depleção grave, para valores menores que 800/mm³ [14,15]. Dos 23 pacientes do estudo, 8 (34,78%) pacientes apresentaram número de linfócitos normal; 5 (21,74%) apresentaram depleção linfocitária grave; 4 (17,39), moderada; 6 (26,0), leve, o que pode ser justificado nos pacientes portadores de sepse, que possuem intensa resposta inflamatória com múltiplos mecanismos de redução dos linfócitos circulantes, tais como maior adesão endotelial e apoptose [6,16].

No momento do diagnóstico da sepse, existem algumas variáveis laboratoriais extremamente importantes correlacionadas com o nível inflamatório / infeccioso dos pacientes, dentre as quais destacam-se a presença de leucocitose (>12.000 leucócitos/ μ L) ou leucopenia (<4000 leucócitos/ μ L); bastonetose (>10% de formas imaturas); e proteína C reativa (PCR) / procalcitonina acima de duas vezes o valor normal. A proteína C reativa (PCR), importante marcador inflamatório utilizado como rotina em pacientes críticos, esteve elevada em todos os pacientes portadores de sepse, como esperado, variando de 3,3 a 26,7mg/L (normal 1mg/L). A proteína C

reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado em resposta a inflamações, decorrente principalmente do aumento de IL-6. As concentrações plasmáticas de PCR aumentam nas primeiras 6 horas após o início do estímulo, atingindo valores de pico em aproximadamente 48 horas e, como sua meia-vida é curta (4 a 9 horas), retornam rapidamente a valores normais após a melhora do processo [82]. Seus valores persistentemente elevados estão relacionados ao agravamento do prognóstico dos pacientes portadores de sepse e ao mau resultado às respostas ao tratamento instituído, assim como a algum processo infeccioso ativo, sendo que possui participação na defesa às infecções por diversos microrganismos, na reabsorção de material necrótico e na regulação de processos inflamatórios [3]. Maiores valores séricos estão relacionados a pior prognóstico e a quadros clínicos mais graves, como o choque séptico [14]. Apenas um paciente apresentou concentração elevada de creatinina (3,61mg/dL), o que está relacionado com hipoperfusão tissular e deficiência orgânica decorrente da falência renal, piorando o prognóstico, sendo que o paciente em questão evoluiu para óbito. Os pacientes do estudo apresentaram concentrações de lactato sérico não elevadas e inferiores a 4,0mmol/L (média de 1,0mmol/L) refletindo um perfil de pacientes que, apesar da presença de sepse pulmonar, necessitavam de estabilidade clínica para a possibilidade de realização de broncoscopia para coleta de amostras de LBA. A concentração de lactato está relacionada a pior prognóstico e indicativo de sepse grave / choque séptico quando seus valores estão maiores que 4,0mmol/L, indicando hipoperfusão com tendência a instabilidade clínica e necessidade de vasopressores [17].

No estudo observou-se que as concentrações de IL-6 foram significativamente aumentadas nas amostras de plasma e de LBA dos pacientes portadores de sepse, enquanto as de IL-2 e IL-4 foram mínimas ou até mesmo insignificantes e não foi observado aumento significativo em outras citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . A medição de biomarcadores circulantes pelo perfil de citocinas pode ser um método prático para descrever o estado imunológico e inflamatório de um paciente séptico, principalmente se associado aos escores clínicos utilizados como APACHE II ou SOFA [13,23]. Porém, como a precisão é diretamente relacionada com a fase da sepse, a ausência ou baixa concentração de biomarcadores pode ser preponderante como alerta na maioria dos pacientes [24]. Como também, TNF- α , IL-1 β e IL-6 não são

considerados biomarcadores "padrão-ouro" de sepse devido à sua meia-vida curta [27]. Concentrações elevadas de IL-6 foram observados em muitas doenças inflamatórias, como doenças cardiovasculares, doenças autoimunes ou câncer e, da mesma forma que a IL-1 β , concentrações consistentemente elevadas de IL-6 mostraram-se associadas à gravidade da sepse, estando as concentrações mais altas associadas aos piores resultados, porém, a contribuição exata da IL-6 para a sepse ainda está sob investigação [28]. O IFN- γ é produzido principalmente por células T CD4⁺ e T CD8⁺, como também em menor quantidade pelas células NK, promove a resposta inflamatória durante a sepse, porém sua produção pode ser atenuada na sepse, provavelmente devido à redução da resposta dos linfócitos durante o estado imunossuprimido [28,31]]. Diferenças podem decorrer do momento da sepse em que o material foi coletado sendo que primeiramente há uma liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea, como a IL-6 e o TNF- α , o qual atuam em sinergismo desde o início deste evento inflamatório, seguido por um período de depleção caracterizado pela CARS, mediada pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e IL-10 [27,32,80]. Foi relatado a possibilidade dos subconjuntos de células NK não serem equivalentes na sua atividade antibacteriana, pois as células NK CD56^{bright} estão relacionadas com a produção de IFN- γ , assim como outras citocinas, enquanto as CD56^{dim}, à maior liberação de perforina e granzima, relacionadas com mecanismos de citotoxicidade [52,53,60]. Esta diferenciação das células NK, que pode afetar a sua função específica no combate às infecções, é influenciada pelo ambiente do tecido, o que pode ser diferente em certos ambientes celulares e moleculares específicos como observado neste estudo, que demonstrou os números celulares nos pulmões, via LBA e o sangue [58]. Porém, no estudo observou-se que os subconjuntos de células NK foram claramente reduzidos em número nas amostras de plasma de pacientes com sepse, em comparação com os controles saudáveis, sem diferenças significativas em relação ao LBA.

Sugeriu-se que a resposta imunológica exacerbada e descontrolada na sepse pode levar à indução de autodestruição de tecidos e disfunção orgânica distante do local de lesão como, por exemplo, o que pode ocorrer nos pulmões [13]. Nosso estudo atual teve como objetivo caracterizar o estado imunológico das células NK tanto no sangue periférico como no LBA de pacientes com pneumonia bacteriana, no qual foi observado uma linfopenia de células NK e de células T CD4⁺ e CD8⁺ tanto no sangue

periférico quanto no LBA de pacientes com sepse. O local da infecção originária da sepse, bem como as variáveis sistêmicas e locais do paciente são historicamente considerados nos escores clínicos que preveem a sobrevivência do paciente [83]. A aquisição de amostras de sangue periférico para o estudo de células imunológicas em pacientes com sepse é comumente realizada devido à conveniência de adquirir esses tipos de amostras. No entanto, devido à natureza da infecção bacteriana, o tipo de leucócitos encontrados no local da infecção pode ser significativamente diferente das células do sangue periférico devido à resposta inflamatória complexa e compartimentada na sepse [84]. Além disso, um recente estudo demonstrou que o microambiente local controla a compartimentalização das respostas das células NK durante a inflamação sistêmica experimental [36]. Até à data, nosso estudo foi o primeiro a comparar essas populações celulares simultaneamente em amostras de sangue periférico e LBA de pacientes sépticos, com o objetivo de mensurar o número das células de forma sistêmica e nos respectivos locais de infecção, como no caso, o pulmão. Curiosamente, tanto as células NK como outros linfócitos tais como as células T CD4⁺ e T CD8⁺ apresentaram linfopenia sanguínea, enquanto nas amostras de LBA não foi observado alterações no número desses subconjuntos celulares. A anergia decorrente da diminuição da resposta das células T observada na maioria dos pacientes sépticos pode ser considerada como tentativa de equilibrar os mecanismos pró-inflamatórios exacerbados que ocorrem logo no início da sepse, o que também pode levar ao desenvolvimento da falência orgânica, observada com a evolução da doença [20].

A linfopenia durante a sepse é fenômeno clinicamente descrito, porém hipotético, que pode estar relacionado com o tráfego das células de defesa para os locais de infecção ou da morte celular. Foi demonstrado que linfopenia é consequência de apoptose linfocitária durante a sepse e que a prevenção da morte de linfócitos melhoraria a sobrevida em camundongos [85]. A administração de IL-7 e IL-15 inverteria a apoptose dos linfócitos e melhoraria a sobrevivência do sepse em modelos de camundongos experimentais [86,87]. Em pacientes humanos foi demonstrado que a linfopenia persistente é preditor de mortalidade e imunossupressão induzida por septicemia [88,89]. Com base nessas descobertas, novos ensaios clínicos estão atualmente sendo avaliados na tentativa de reverter a linfopenia e a imunossupressão induzida pela sepse. Por outro lado, em contraste com

a hipótese de linfopenia induzida pela morte celular, verificou-se em modelos de sepse peritoneal experimental, as células NK murinas migram para a cavidade peritoneal via mecanismo induzido por quimiocinas, resultando em linfopenia do sangue periférico, o que sugere que a linfopenia pode ser consequência da quimiotaxia das células para o local da infecção [74]. Uma possível hipótese, que pode explicar a linfopenia do sangue periférico, mas os níveis celulares inalterados em outros compartimentos, é que a ativação celular pode resultar em moléculas de adesão celular aumentadas que ancoram linfócitos específicos para a parede endotelial, o que poderia resultar em linfócitos menos solúveis no sangue, o que se assemelharia a um cenário de linfopenia do sangue periférico [90]. Embora a sepse experimental seja uma poderosa ferramenta usada para entender os mecanismos das respostas imunológicas na sepse, a variabilidade da resposta imunológica aos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) entre diferentes espécies pode variar em mais de 10.000 vezes entre os camundongos e os seres humanos, o que pode não ser tão fidedigno com o que ocorre em humanos [91,92]. Nosso estudo apoia a hipótese de que a linfopenia na sepse é provavelmente associada à morte celular induzida por apoptose durante um evento inflamatório exagerado, porém, como o estudo foi limitado a amostras de LBA, existe a possibilidade de que o uso de amostras homogeneizadas de biópsias pulmonares possa revelar um desfecho diferente [93]. Neste estudo foi abordado o conceito de números de subconjuntos de células NK em diferentes compartimentos em pacientes com sepse, sendo demonstrado que a linfopenia sanguínea não está necessariamente associada a níveis aumentados dessas células no local da infecção, como no caso, nas amostras de LBA de pacientes portadores de sepse pulmonar.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Os leucócitos encontrados no local da infecção podem diferir daqueles observados no plasma devido à resposta inflamatória complexa e compartimentalizada decorrente da sepse, de forma que a linfopenia no plasma e valores inalterados em outros compartimentos pode ser decorrente da ativação celular e maior expressão de moléculas de adesão celular que ancoram linfócitos específicos à parede endotelial reduzindo sua população solúvel e disponível no sangue, como também pode ser decorrente dos processos de apoptose linfocitária. Em relação às citocinas pró-inflamatórias nos pacientes sépticos, embora se saiba que elas são determinantes na patogênese da sepse e estão envolvidas tanto na progressão da doença, quanto no estabelecimento da CARS, não há consenso em relação aos mediadores inflamatórios mensuráveis na corrente sanguínea de pacientes portadores de sepse, assim como dos reais mecanismos da diferença observada nas concentrações de citocinas no sangue e nos locais de infecção. Apesar dos avanços em cuidados médicos gerais e novas informações sobre a fisiopatologia da sepse, esta desordem continua a ser uma entidade clínica complexa com taxa de mortalidade inaceitavelmente elevada, a qual está relacionada ao desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos e sistemas, que deve ser evitada ao prevenir-se a instituição da “tempestade de citocinas”, ambas frequentemente irreversíveis. Há evidências da influência do estado nutricional dos pacientes portadores de sepse na sua capacidade de resposta às infecções, o que pode ser potencializada pela presença de deficiências de certas vitaminas e nutrientes, como a vitamina D, comprovadamente relacionada com a capacidade de resposta imunológica inata ligada ao trato respiratório. Há muitas dificuldades em identificar um alvo terapêutico eficaz para melhorar os resultados clínicos na sepse, pois devido à complexidade dos eventos observados e da sua fisiopatologia multifatorial, ainda é necessária melhor compreensão de sua patogênese.

8 CONCLUSÕES:

No estudo, observou-se que as células NK estão presentes no LBA de pacientes portadores de sepse pulmonar, sem alterações no padrão de subconjuntos celulares de células NK (CD56^{bright} e T CD56^{dim}) e de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e sem diferenças significativas em relação ao padrão de subconjuntos encontrado no LBA do grupo controle.

Em relação ao perfil de citocinas pró-inflamatórias observado em pacientes portadores de sepse pulmonar, observou-se que a concentrações de IL-6 foi significativamente aumentada nas amostras de plasma e de LBA dos pacientes portadores de sepse, não sendo observado aumento significativo em outras citocinas pró-inflamatórias analisadas, como IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α .

Houve elevada prevalência de desnutrição e de deficiência / insuficiência de vitamina D nos pacientes portadores de sepse pulmonar, o que pode interferir com a resposta imunológica inata do hospedeiro às infecções.

REFERÊNCIAS:

1. Seymour, C.W.; Liu, V.X.; Iwashyna, T.J.; Brunkhorst, F.M.; Rea, T.D.; Scherag, A.; Rubenfeld, G.; Kahn, J.M.; Shankar-Hari, M.; Singer, M.; et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016, 315, 762–774.
2. Shankar-Hari, M.; Phillips, G.S.; Levy, M.L.; Seymour, C.W.; Liu, V.X.; Deutschman, C.S.; Angus, D.C.; Rubenfeld, G.D.; Singer, M.; Sepsis Definitions Task, F. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016, 315, 775–787.
3. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
4. Herrán-Monge R, Muriel-Bombín A, García-García MM, Merino-García PA, Martínez-Barrios M, Andaluz D, Ballesteros JC, Domínguez-Berrot AM, Moradillo-Gonzalez S, Macías S, Álvarez-Martínez B, Fernández-Calavia MJ, Tarancón C, Villar J, Blanco J; GRECIA Network. Epidemiology and Changes in Mortality of Sepsis After the Implementation of Surviving Sepsis Campaign Guidelines. *J Intensive Care Med*. 2017 Jan 1;885066617711882.
5. Ward, P. A. and M. Bosmann (2012). "A historical perspective on sepsis." *The American journal of pathology* 181(1): 2-7.
6. Taeb AM, Hooper MH, Marik PE. Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Nutr Clin Pract*. 2017 Jun;32(3):296-308.
7. Hattori Y, Hattori K, Suzuki T, Matsuda N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. *Pharmacol Ther*. 2017.
8. Angus, D.C.; Linde-Zwirble, W.T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the united states: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med*. 2001, 29, 1303–1310.

9. Dombrovskiy, V. Y., A. A. Martin, et al. (2007). "Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003." *Critical Care Medicine* 35(5): 1244-1250.
10. Martin, G. S., D. M. Mannino, et al. (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." *New England Journal of Medicine* 348(16): 1546-1554.
11. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*, 2004;8:R251-R260.
12. Sales Junior JA, David CM, Hatum R, et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2006;18:9-17.
13. Rochwerg B, Oczkowski S, Siemieniuk RA, Menon K, Szczeklik W, English S, Agoritsas T, Belley-Cote E, D'Aragon F, Alhazzani W, Duan E, Gossack-Keenan K, Sevransky J, Vandvik P, Venkatesh B, Guyatt G, Annane D. Corticosteroids in sepsis: an updated systematic review and meta-analysis (protocol). *BMJ Open*. 2017 Jun 30;7(6):e016847.
14. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*. 2013 Feb;39(2):165-228.
15. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochwerg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellinghan GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis

- Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 2017 Mar;43(3):304-377.
16. Schulte,W; Bernhagen, J.; Bucala, R. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets—An updated view. *Mediat. Inflamm.* 2013, 2013, 165974.
 17. Garcia-Obregon S, Azkargorta M, Seijas I, Pilar-Orive J, Borrego F, Elortza F, Boyano MD, Astigarraga I. Identification of a panel of serum protein markers in early stage of sepsis and its validation in a cohort of patients. *J Microbiol Immunol Infect.* 2017 Jun 13. pii: S1684-1182(17)30053-1.
 18. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Parlato, M.; Fitting, C.; Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M. NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 2012, 188, 5850–5858.
 19. Herzum, I. and H. Renz (2008). "Inflammatory markers in SIRS, sepsis and septic shock." *Current Medicinal Chemistry* 15(6): 581-587.
 20. Polat G, Ugan RA, Cadirci E, Halici Z. Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches. *Eurasian J Med.* 2017 Feb;49(1):53-58.
 21. Binkowska AM, Michalak G, Słotwiński R. Current views on the mechanisms of immune responses to trauma and infection. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40(2):206-16.
 22. Adib-Conquy, M.; Scott-Algara, D.; Cavaillon, J.M.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol. Cell Biol.* 2014, 92, 256–262.
 23. Cook, R., D. Cook, et al. (2001). "Multiple organ dysfunction: Baseline and serial component scores." *Critical Care Medicine* 29(11): 2046-2050.
 24. Osuchowski MF, Craciun F, Weixelbaumer KM, Duffy ER, Remick DG. Sepsis chronically in MARS: systemic cytokine responses are always mixed regardless of the outcome, magnitude, or phase of sepsis. *J Immunol.* 2012 Nov 1;189(9):4648-56.
 25. Zanon F, Caovilla JJ, Michel RS, Cabeda EV, Ceretta DF, Luckemeyer GD, Beltrame C, Posenatto N. Sepsis in the intensive care unit: etiologies, prognostic factors and mortality. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2008 Jun;20(2):128-34.

26. Khaertynov KS, Boichuk SV, Khaiboullina SF, Anokhin VA, Andreeva AA, Lombardi VC, Satrutdinov MA, Agafonova EA, Rizvanov AA. Comparative Assessment of Cytokine Pattern in Early and Late Onset of Neonatal Sepsis. *J Immunol Res*. 2017;2017:8601063.
27. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul;39(5):517-528.
28. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, 420, 885–891.
29. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: Natural killer cells in sepsis—Guilty or not guilty? *Crit. Care* 2013, 17, 235.
30. Rasid, O.; Cavaillon, J.M. Recent developments in severe sepsis research: From bench to bedside and back. *Future Microbiol*. 2016, 11, 293–314.
31. Gerlach H. Agents to reduce cytokine storm. *F1000 Res*. 2016 Dec 22;5:2909.
32. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. (2003) Cytokine cascade in sepsis. *Scand. J. Infect. Dis*. 35:535–44.
33. Annane, D.; Bellissant, E.; Cavaillon, J.M. Septic shock. *Lancet* 2005, 365, 63–78.
34. Cavaillon, J. M. (2011). "The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff." *Journal of Leukocyte Biology* 90(3): 413-424.
35. Bone, R.C. Sir isaac newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med*. 1996, 24, 1125–1128.
36. Parlato, M.; Cavaillon, J.M. Host response biomarkers in the diagnosis of sepsis: A general overview. *Methods Mol. Biol*. 2015, 1237, 149–211.
37. Adib-Conquy, M.; Cavaillon, J.M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost*. 2009, 101, 36–47.
38. Cavaillon, J. M., C. Munoz, et al. (1992). Circulating cytokines - the tip of the iceberg. *Circulatory Shock* 38(2): 145-152.
39. Pathan, N., C. A. Hemingway, et al. (2004). "Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock." *Lancet* 363(9404): 203-209.
40. Hein, F., F. Massin, et al. (2010). "The relationship between CD4(+)CD25(+)CD127(-) regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states." *Critical Care* 14(1).

41. De Jong, H.K.; van der Poll, T.; Wiersinga, W.J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J. Innate Immun.* 2010, 2, 422–430.
42. de Pablo, R., J. Monserrat, et al. (2012). "Sepsis-induced acute respiratory distress syndrome with fatal outcome is associated to increased serum transforming growth factor beta 1 levels." *European Journal of Internal Medicine* 23(4): 358-362.
43. Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (1989). "2 types of mouse t-helper cell .4. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." *Journal of Experimental Medicine* 170(6): 2081-2095.
44. Moore, K. W., R. D. Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annual Review of Immunology* 19: 683-765.
45. Friedman, G., S. Jankowski, et al. (1997). "Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock." *Journal of Critical Care* 12(4): 183-187.
46. Nakamura, K., A. Kitani, et al. (2004). "TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4(+)CD25(+) regulatory T cell activity in both humans and mice." *Journal of Immunology* 172(2):834-842.
47. Hiraki, S., S. Ono, et al. (2012). "Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor-beta decreases the percentages of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival." *Surgery* 151(2): 313-322.
48. Miller, J. F. A., K. T. Brunner, et al. (1971). "Thymus-Derived Cells as Killer Cells in Cell Mediated Immunity." *Transplantation Proceedings* 3(1): 915-&.
49. Lanier, L. L., J. H. Phillips, et al. (1986). "Natural-killer-cells - definition of a cell type rather than a function." *Journal of Immunology* 137(9): 2735-2739.
50. Colucci, F., M. A. Caligiuri, et al. (2003). "What does it take to make a natural killer?" *Nature Reviews Immunology* 3(5): 413-425.
51. Bone, R.C.; Sibbald, W.J.; Sprung, C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992, 101, 1481–1483.
52. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Adib-Conquy, M.; Cavaillon, J.M. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: Angels or devils? *Mol. Med.* 2012, 18, 270–285.
53. Huntington ND, Vosshenrich CAJ, Di Santo JP. (2007) Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat. Rev. Immunol.* 7:703–14.

54. Stetson, D. B., M. Mohrs, et al. (2003). "Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function." *Journal of Experimental Medicine* 198(7): 1069-1076.
55. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Parlato, M.; Philippart, F.; Misset, B.; Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M.; Captain Study Group. Toll-like receptors expression and interferon-gamma production by NK cells in human sepsis. *Crit. Care* 2012, 16, R206.
56. Beutler B, *et al.* (2007) Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7:753–66.
57. Sathe, P.; Delconte, R.B.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Seillet, C.; Chopin, M.; Vandenberg, C.J.; Rankin, L.C.; Mielke, L.A.; Vikstrom, I.; Kolesnik, T.B.; et al. Innate immunodeficiency following genetic ablation of MCL1 in natural killer cells. *Nat. Commun.* 2014, 5, 4539.
58. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. NK cell-based immunotherapies: Awakening the innate anti-cancer response. *Discov. Med.* 2016, 21, 197–203.
59. Mera, S.; Tatulescu, D.; Cismaru, C.; Bondor, C.; Slavcovici, A.; Zanc, V.; Carstina, D.; Oltean, M. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS* 2011, 119, 155–163.
60. Batoni G, *et al.* (2005) Human CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets respond differentially to direct stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Scand. J. Immunol.* 62:498–506.
61. Herzig, D.S.; Driver, B.R.; Fang, G.; Toliver-Kinsky, T.E.; Shute, E.N.; Sherwood, E.R. Regulation of lymphocyte trafficking by CXC chemokine receptor 3 during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012, 185, 291–300.
62. Calle Pascual AL, Torrejón MJ. Vitamin D and its "non-classical" effects. *Rev Esp Salud Publica* 86(5):453-9, 2012.
63. Izadpanah M, Khalili H. Potential benefits of vitamin D supplementation in critically ill patients. *Immunotherapy* 5(8):843-53, 2013.
64. Flynn L, Zimmerman LH, McNorton K, Dolman M, Tyburski J, Baylor A, Wilson R, Dolman H. Effects of vitamin D deficiency in critically ill surgical patients. *Am J Surg* 203(3):379-82, 2012
65. Gerke AK, Pezzulo AA, Tang F, Cavanaugh JE, Bair TB, Phillips E, Powers LS, Monick MM. Effects of vitamin D supplementation on alveolar macrophage

- gene expression: preliminary results of a randomized, controlled trial. *Multidiscip Respir Med* 26(9):4-7, 2014.
66. Al Nozha OM. Vitamin D and extra-skeletal health: causality or consequence. *Int J Health Sci (Qassim)* 10(3):443-52, 2016.
 67. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients* 7(10):8251-60, 2015.
 68. Solidoro P, Bellocchia M, Facchini F. The immunobiological and clinical role of vitamin D in obstructive lung diseases. *Minerva Med* 107(3):12-9, 2016.
 69. Xu S, Chen YH, Tan ZX, Xie DD, Zhang C, Zhang ZH, Wang H, Zhao H, Yu DX, Xu DX. Vitamin D3 pretreatment regulates renal inflammatory responses during lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Sci Rep* 22(5):18687, 2015.
 70. Waitzberg DL, Caiaffa WT, Correia MITD. Inquérito brasileiro de avaliação nutricional hospitalar (IBRANUTRI). *Rev Bras Nutr Clin.* 1999;14:123-33.
 71. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:538-48.
 72. Santos NS, Draibe SA, Kamimura MA et al. Is serum albumin a marker of nutritional status in hemodialysis patients without evidence of inflammation? *Artif Organs* 2003; 27:681-6.
 73. Lorente, J. A. and J. C. Marshall (2005). Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis. *Shock* 24: 107-119.
 74. Tracey, K. J., Y. Fong, et al. (1987). Anti-cachectin tn timer monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330(6149): 662-664.
 75. Qiu F, Maniar A, Quevedo Diaz M, Chapoval AI, Medvedev AE. (2011) Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of toll-like and NOD-like receptors. *Innate Immun.* 17:375–87.
 76. Abraham, E. (1997). "Therapies for sepsis - Emerging therapies for sepsis and septic shock." *Western Journal of Medicine* 166(3): 195-200.
 77. Netea, M. G., G. Fantuzzi, et al. (2000). Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia. *Journal of Immunology* 164(5): 2644-2649.

78. Doherty GM, *et al.* (1992) Evidence for IFN γ as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* 149:1666–70.
79. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Parlato, M.; Fitting, C.; Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M. NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 2012, 188, 5850–5858.
80. Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit. Care Med.* 2005, 33, S506–S509.
81. Owens M, Loken M. Flow cytometry principles for clinical laboratory practice. Quality assurance for quantitative immunophenotyping. New York: Ed. Wiley-Liss, 1995.
82. Póvoa P. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med* 2002;28:235-43.
83. Ponting, G.A.; Sim, A.J.; Dudley, H.A. Comparison of the local and systemic effects of sepsis in predicting survival. *Br. J. Surg.* 1987, 74, 750–752.
84. Cavaillon, J.M.; Annane, D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J. Endotoxin Res.* 2006, 12, 151–170.
85. Hotchkiss, R.S.; Tinsley, K.W.; Swanson, P.E.; Chang, K.C.; Cobb, J.P.; Buchman, T.G.; Korsmeyer, S.J.; Karl, I.E. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 14541–14546.
86. Inoue, S.; Unsinger, J.; Davis, C.G.; Muenzer, J.T.; Ferguson, T.A.; Chang, K.; Osborne, D.F.; Clark, A.T.; Coopersmith, C.M.; McDunn, J.E.; *et al.* IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* 2010, 184, 1401–1409.
87. Unsinger, J.; McGlynn, M.; Kasten, K.R.; Hoekzema, A.S.; Watanabe, E.; Muenzer, J.T.; McDonough, J.S.; Tschoep, J.; Ferguson, T.A.; McDunn, J.E.; *et al.* IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* 2010, 184, 3768–3779.
88. Drewry, A.M.; Samra, N.; Skrupky, L.P.; Fuller, B.M.; Compton, S.M.; Hotchkiss, R.S. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* 2014, 42, 383–391.
89. Andaluz-Ojeda, D.; Iglesias, V.; Bobillo, F.; Almansa, R.; Rico, L.; Gandia, F.; Loma, A.M.; Nieto, C.; Diego, R.; Ramos, E.; *et al.* Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care* 2011, 15, R243.

90. Oppenheimer-Marks, N.; Davis, L.S.; Lipsky, P.E. Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration. Alteration of receptor use relates to the activation status of both the T cell and the endothelial cell. *J. Immunol.* 1990, 145, 140–148.
91. Warren, H.S.; Fitting, C.; Hoff, E.; Adib-Conquy, M.; Beasley-Topliffe, L.; Tesini, B.; Liang, X.; Valentine, C.; Hellman, J.; Hayden, D.; et al. Resilience to bacterial infection: Difference between species could be due to proteins in serum. *J. Infect. Dis.* 2010, 201, 223–232.
92. Seok, J.; Warren, H.S.; Cuenca, A.G.; Mindrinos, M.N.; Baker, H.V.; Xu, W.; Richards, D.R.; McDonald-Smith, G.P.; Gao, H.; Hennessy, L.; et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 3507–3512.
93. Girardot, T.; Rimmelé, T.; Venet, F.; Monneret, G. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis* 2016, 22, 295–305.

NORMAS ADOTADAS:

1. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6021: informação e documentação – publicação periódica técnica e/ou científica – apresentação. 2. Ed. Rio de Janeiro: ABNT, 2015.

2. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10520: informação e documentação: apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

3. Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas. Normas para apresentação de artigos propostos para publicação em revistas médicas. Normas de Vancouver. Rev Port Clin Geral 1997;14:159-74. Disponível em: <http://homepage.esoterica.pt/~nx2fmd/Normas.html>.

BASES DE DADOS CONSULTADAS:

1. FERREIRA ABH. Novo Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa. 5 ed. Curitiba: Ed. Positivo; 2014.
2. STEVENSON A, LINDBERG CA. New Oxford American Dictionary. 3 ed. USA: Ed. Oxford University Press; 2010.

ANEXO 1 - BRONCOSCOPIA E LAVADO BRONCOALVEOLAR

1 BRONCOSCOPIA:

Broncoscopia é um procedimento endoscópico que visualiza a árvore traqueobrônquica através de um instrumento óptico inserido nas vias aéreas, com ampla capacidade diagnóstica e terapêutica [1]. A forma mais utilizada, dada a sua praticidade e custos, é a broncoscopia flexível adaptada a uma fonte de luz branca alógena padrão, com capacidade de acessar as vias aéreas inferiores até a terceira ordem dos brônquios [2]. As imagens são obtidas através de fibras ópticas ou uma pequena câmera na extremidade distal do aparelho, o qual também apresenta um canal de trabalho para introdução de instrumentação endoscópica específica como pinças, agulhas de punção e escovas, assim como para instilação de medicações, soluções e aspiração de conteúdo [3].

O broncoscópio é dito flexível por ter a capacidade de flexionar sua extremidade distal superior ou inferiormente, permitindo sua inserção através das vias aéreas curvas, possibilitando atingir as vias aéreas mais distantes [1,4]. Um broncoscópio flexível comum tem três partes: a porção de controle, que apresenta uma alavanca para flexionar ou estender a porção distal do broncoscópio, um portal de sucção para conexão do sistema de aspiração a vácuo e uma abertura para o canal de trabalho através da qual os instrumentos ou soluções são inseridos; o eixo flexível que contém cabos dentro de uma bainha que permitem flexão e extensão da porção distal com o acionamento da alavanca, cabos de iluminação / imagem de fibra óptica e o canal de trabalho; a ponta distal que se insere através da via aérea do paciente, que possui um elemento de recuperação de imagem, um componente de iluminação e a abertura do canal de trabalho (figura 1) [4].

A broncoscopia flexível é um procedimento que visualiza o lúmen e a mucosa traqueal, vias aéreas proximais e via aérea segmentar até a terceira geração de ramificações, como ilustrado na figura 2 [1]. Este procedimento é utilizado para o diagnóstico e tratamento de patologias existentes tanto dentro quanto adjacentes às vias aéreas, estando suas indicações mais frequentes representadas na tabela 1 [5].

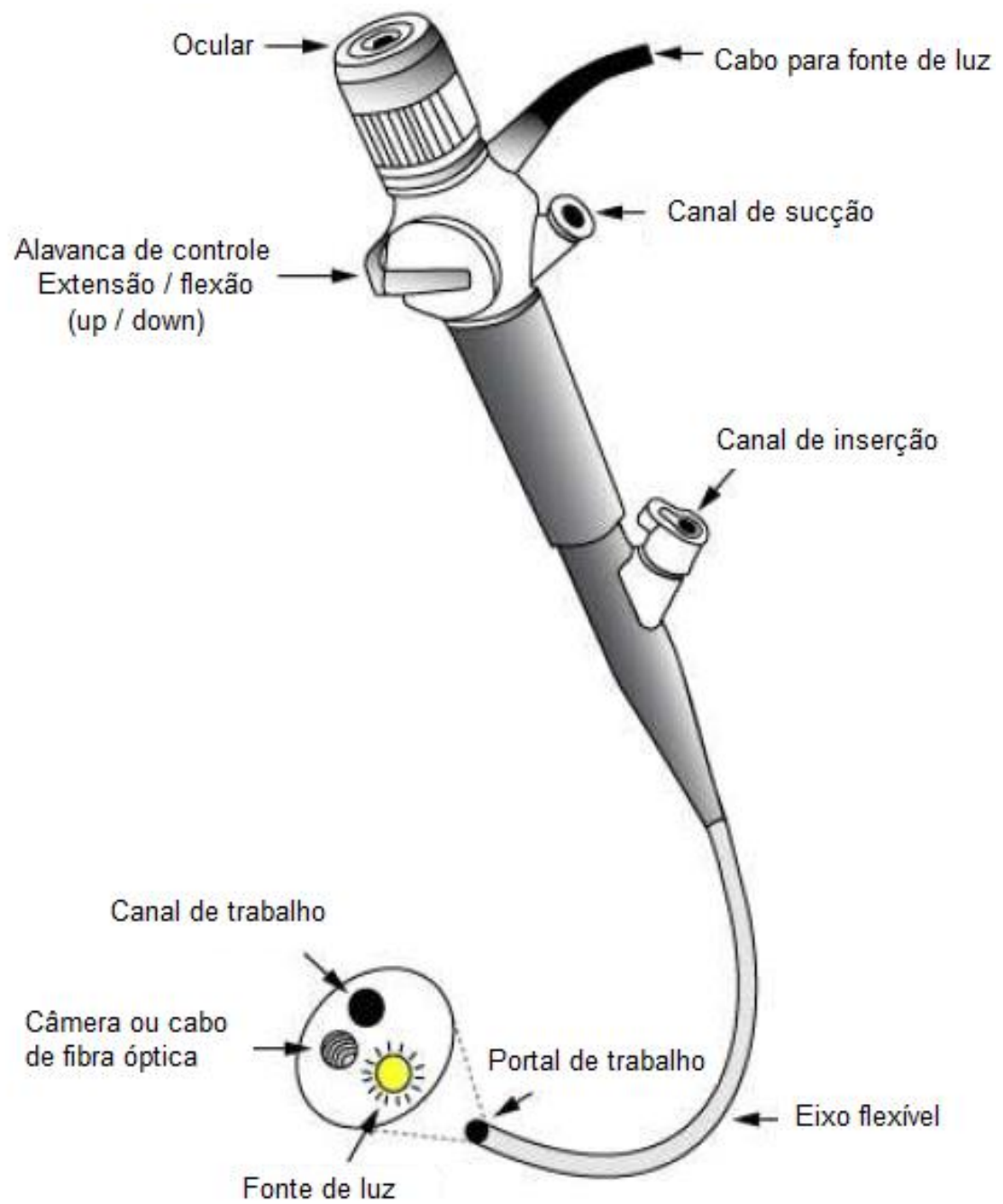


Figura 1. Porções do broncoscópio flexível [4].

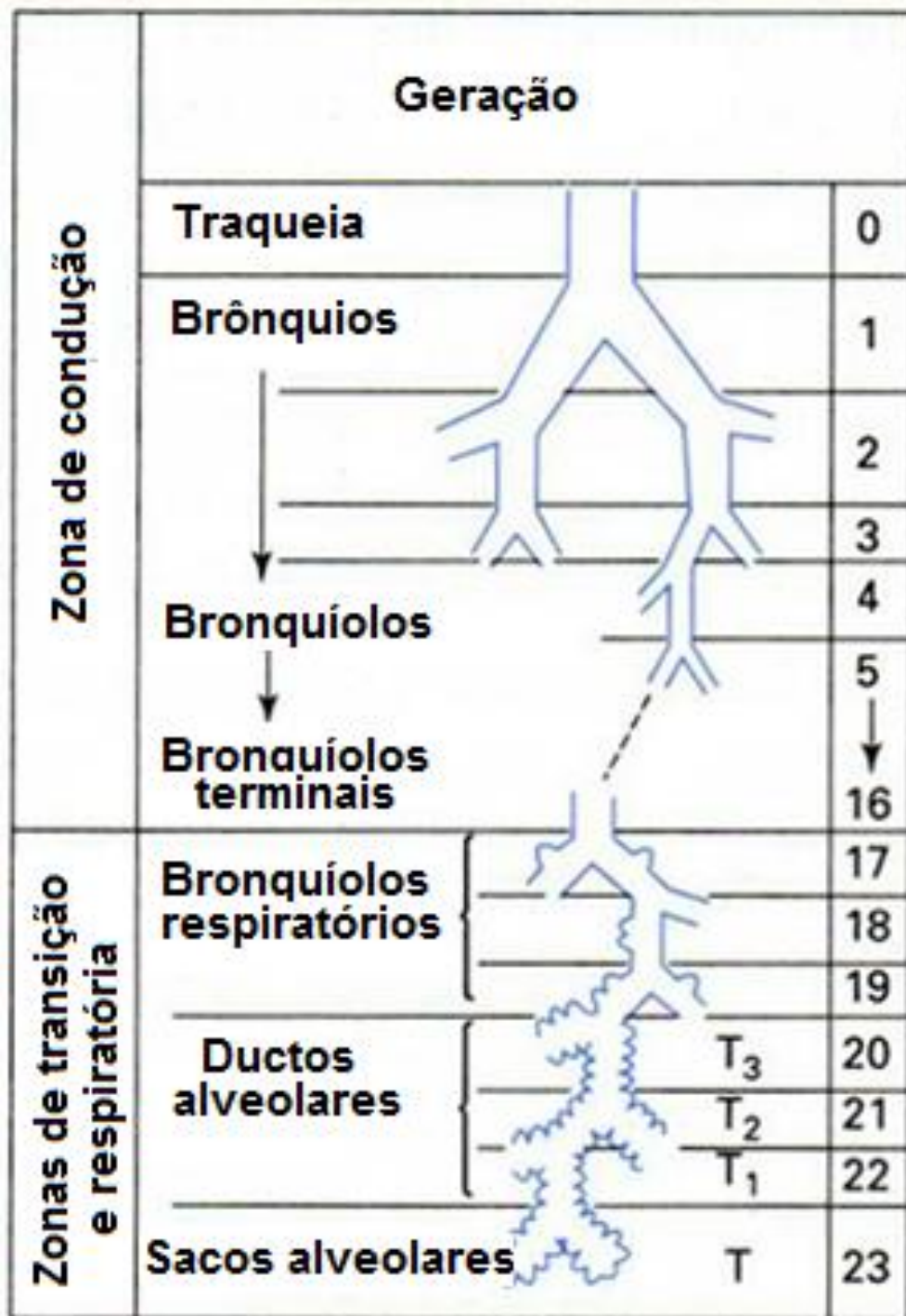


Figura 2. Esquema que representa a subdivisão dicotômica das vias aéreas no pulmão humano a partir da traqueia até os sacos alveolares com a numeração da respectiva geração de ramificação. Broncoscopia Diagnóstica e Terapêutica [1].

Tabela 1. Indicações para broncoscopia [5].

Inspeção:

Tosse persistente e/ou inexplicável

Hemoptise

Sibilância localizada e/ou fixa

Paralisia diafragmática

Rouquidão ou estridor inexplicável com ou sem paralisia de cordas vocais

Suspeita de fístula tráqueo-esofágica

Trauma torácico

Suspeita de traqueomalácia

Inalação tóxica ou queimadura de vias aéreas

Verificar localização de traqueostomia ou tubo endotraqueal

Avaliar lesões pré-cancerosas (autofluorescência)

Avaliação pulmonar de doadores para transplante pulmonar

Coleta de material (biópsia, LBA) ou outro procedimento:

Hiperinflação ou hiperlucência pulmonar focal ou unilateral

Localização da fístula bronco-pleural

Atelectasia persistente

Derrame pleural

Massa paratraqueal, mediastinal ou hilar

Massa / nódulo parenquimatoso

Pneumonia recorrente

Pneumonia nosocomial

Pneumonia em indivíduos imunocomprometidos

Corpo estranho nas vias aéreas (conhecido ou suspeito)

Avaliação de rejeição em receptor de transplante pulmonar

Braquiterapia

Pesquisa

2 LAVADO BRONCOALVEOLAR:

O lavado broncoalveolar (LBA) é um fluido coletado através de broncoscopia, um exame endoscópico específico para avaliação das vias aéreas inferiores [6]. A anatomia das vias aéreas pode ser avaliada conforme a Classificação de Jackson-Huber com a denominação dos seus segmentos de acordo com a orientação espacial (anterior/posterior; superior/inferior; e medial/lateral) ou conforme a classificação cirúrgica de Boyden, que determina os números segundo os segmentos das vias aéreas (figura 3 e 4) [1,7]. Trata-se de um método minimamente invasivo que fornece informações importantes sobre processos imunológicos, inflamatórios e infecciosos que ocorrem a nível alveolar [8]. Na vigência de sepse de origem pulmonar a coleta de LBA por broncoscopia é indicada, quando possível, para orientação da melhor escolha do antibiótico de acordo com o germe isolado nas culturas do fluido aspirado, como também para limpeza da árvore brônquica com aspiração de múltiplas rolhas de secreção para desobstrução brônquica visando melhorar o padrão ventilatório do paciente [9,10]. O LBA é considerado uma forma de biópsia pulmonar líquida, no qual cerca de 1ml de secreção adequadamente coletada abrange uma área de um milhão de alvéolos, o que equivale a um compartimento de aproximadamente 1,5 a 3% do parênquima pulmonar [1,3]. O LBA permite o recolhimento de células e exsudato inflamatório, com importante papel na elucidação diagnóstica de diversas patologias como identificação de fatores de infecção, neoplasias pulmonares, avaliação de componentes celulares na asma e doenças intersticiais [11,12,13].

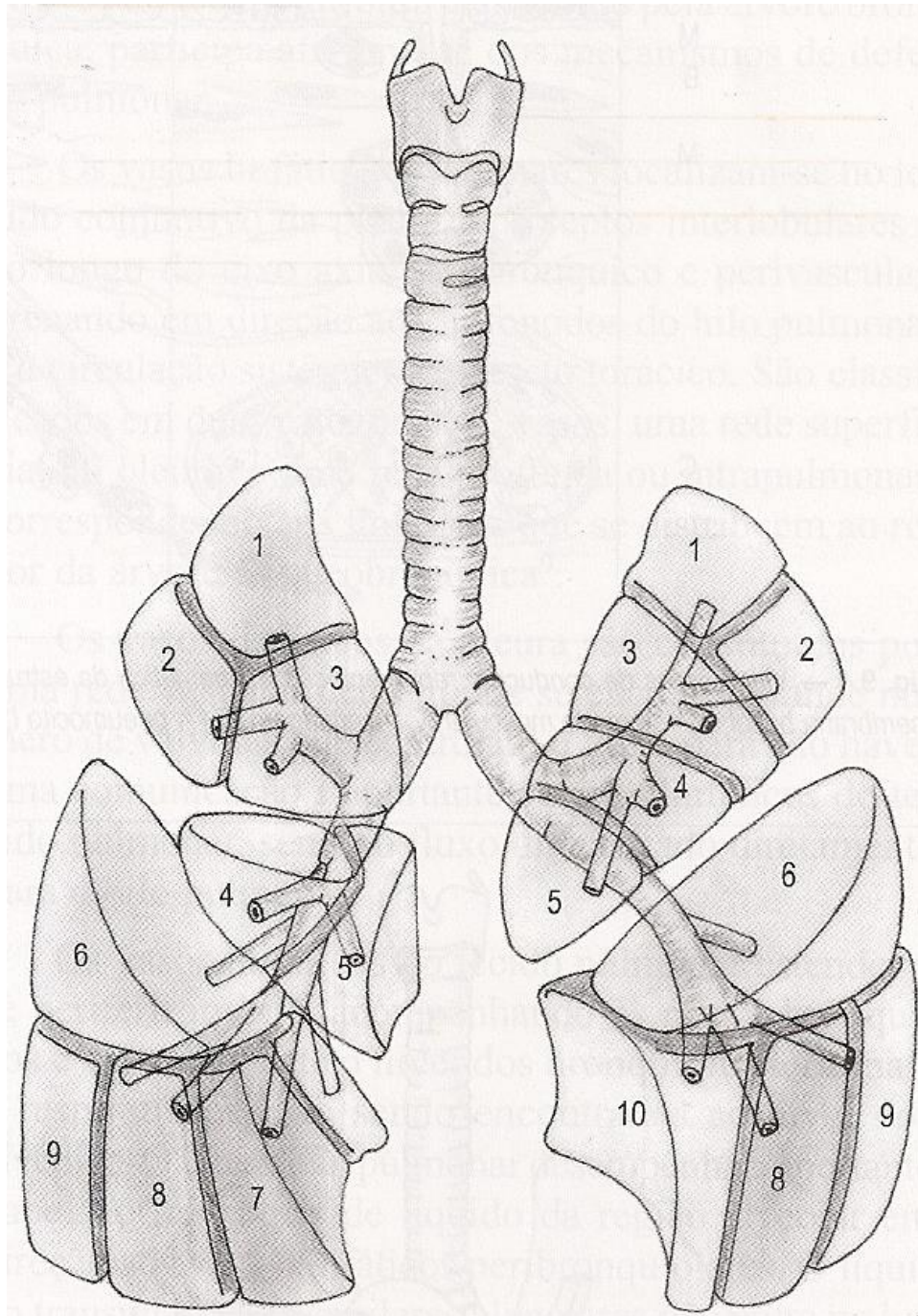


Figura 3. Representação esquemática dos segmentos bronco pulmonares do pulmão humano. Pulmão direito: Lobo superior - segmentos 1) apical; 2) posterior e 3) anterior. Lobo médio – segmentos 4) lateral e 5) medial. Lobo inferior direito – segmentos 6) superior (apical); 7) medial basal; 8) anterior basal; 9) lateral basal e 10) posterior basal. Pulmão esquerdo: Lobo superior – segmentos 1-2) apical posterior; 3) anterior; 4) lingular superior; 5) lingular inferior. Lobo inferior esquerdo – segmentos 6) superior; 7-8) ântero-medial basal; 9) lateral basal e 10) posterior basal [1].

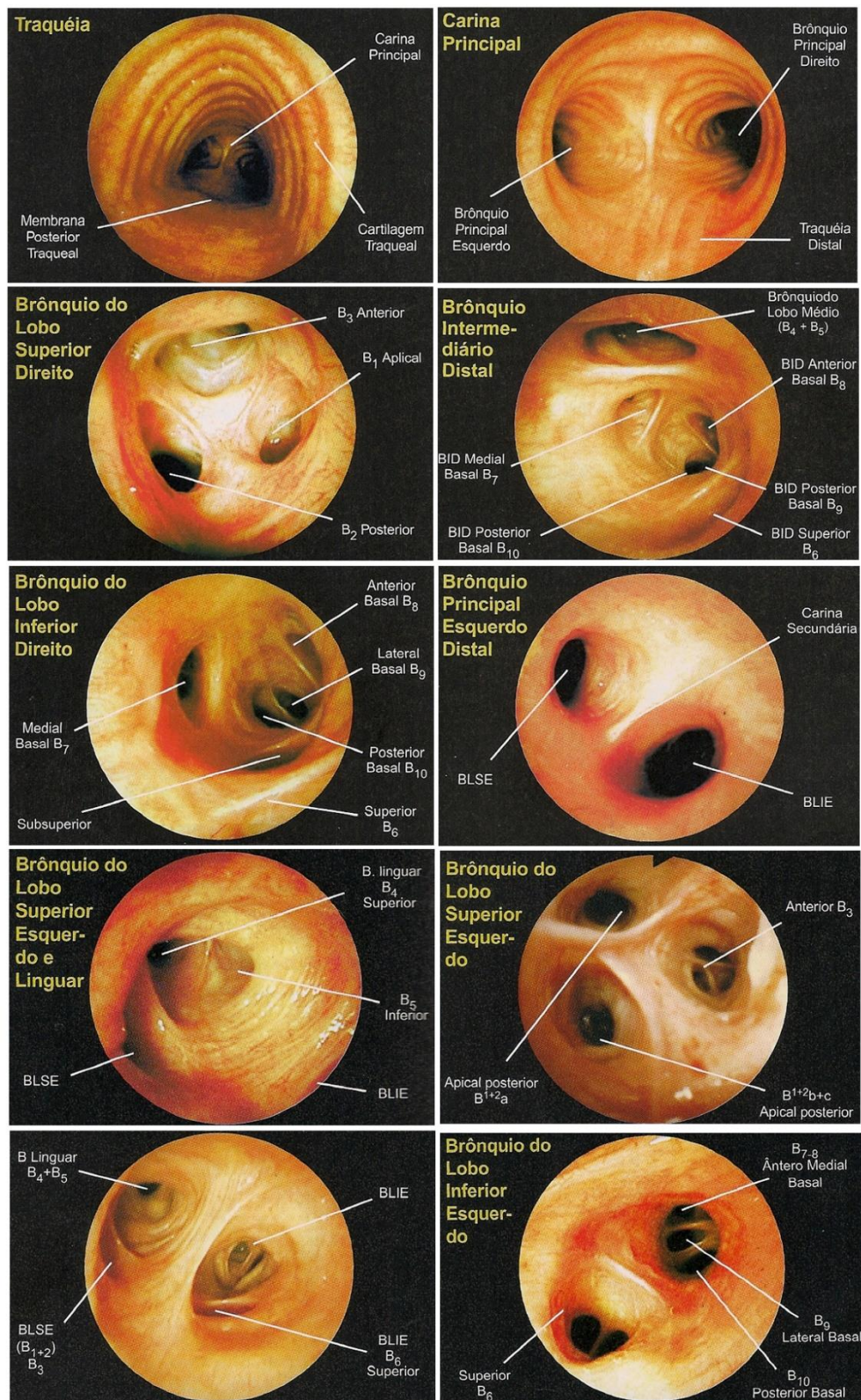


Figura 4. Imagens endoscópicas principais, usando a nomenclatura padrão com o examinador por detrás do paciente [7].

Durante o exame de broncoscopia o aparelho é introduzido pelo broncoscopista posicionado em pé e por detrás da cabeça do paciente, que se encontra em posição supina em decúbito dorsal horizontal. Para o exame é utilizado sedação com Propofol (10mg/ml) a 1,5 a 2,5 mg/kg e anestesia tópica com Cloridrato de Lidocaína a 1% (10mg/ml) sem vaso constritor, com suplementação de oxigênio através de cateter nasal a 3l/min durante a realização do exame e até sua recuperação anestésica [14]. Para a técnica de coleta de LBA, primeiramente faz-se uma inspeção broncoscópica das vias aéreas seguido de aspiração de conteúdo grosseiro impactado nos brônquios como excesso de muco, secreção purulenta ou coágulos, para então identificar-se a anatomia das vias aéreas [7]. Então o broncoscópio é impactado em cunha, como demonstrado na figura 5, num brônquio subsegmentar de terceira ou quarta ordem, de acordo com as subdivisões dicotômicas das vias aéreas, nas regiões segmentares acometidas do pulmão anormal, seguido de injeção de alíquotas de 20 a 50ml de solução salina de NaCl 0,9% (até um total de 100 a 200ml) para posterior aspiração com um volume total de retorno de no mínimo 40% do volume injetado, coletado num frasco siliconado do tipo sifão conectado no canal de aspiração do broncoscópio (figura 6) [2,14]. A solução salina deve ser estéril, não bacteriostática, e pode ser infundida aquecida a 37°C ou em temperatura ambiente [2]. Quando possível e de acordo com a tolerância do paciente ao procedimento, pode-se atrasar a recuperação imediata da solução por alguns segundos e permitir que o paciente respire dois ou mais ciclos respiratórios para fornecer uma melhor mistura com as secreções alveolares [1]. A pressão de aspiração deve ser de 20 a 80mmHg para evitar-se sangramento, colapso brônquico distal e/ou traumatismo das células, o que pode ser conseguido com o pressionamento parcial da válvula de sucção do broncoscópio [3]. O líquido deve ser recuperado em recipientes siliconados como um sifão de coleta estéril conectado na sucção do aparelho, pois os de vidro podem causar aderências dos macrófagos [1,4]. O material deve ser processado o mais rápido possível pois as células permanecem viáveis por no máximo quatro horas quando armazenadas a 25°C [8]. É importante evitar a aspiração ao passar pela nasofaringe e pelas vias aéreas centrais antes do LBA como também limitar a quantidade de lidocaína instilada no canal de trabalho, pois ambos podem alterar o rendimento celular da amostra [3].

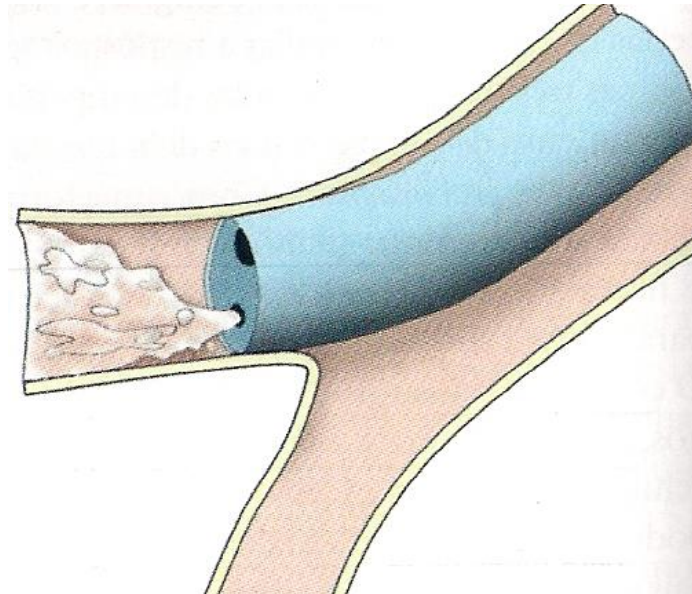


Figura 5. Posição em cunha do broncoscópio para LBA na terceira e quarta ordem dos brônquios segmentares. Broncoscopia [2].



Figura 6. Frasco coletor siliconado conectado no canal de aspiração do broncoscópio flexível [14].

Na preparação do LBA primeiramente realiza-se uma filtração inicial para retirada do excesso de muco, seguido de processo de centrifugação no qual o sobrenadante líquido é enviado para análise das substâncias não celulares e o sedimento diluído em 5ml de solução salina tamponada seguido de nova suspensão e contagem do número total de células através de esfregaço [14]. Depois é realizado centrifugação do material sendo o sedimento então analisado através de esfregaço

para a contagem diferencial celular sendo possível o material ser reservado para análises posteriores. Em controles normais o conteúdo celular do LBA consiste em 85 a 95% de macrófagos, 3 a 12% de linfócitos e 1 a 3% de neutrófilos, eosinófilos ou basófilos [1,2,3]. E uma amostra insatisfatória pode ser definida como a falta de macrófagos alveolares, excesso de células epiteliais das vias aéreas (>5%) e uma abundância de material purulento das vias aéreas centrais [3].



REFERÊNCIAS:

1. Gregório MG, Jacomelli M, Tedde M. Endoscopia Respiratória. In: Barreto SSM, Fiterman J, Lima MA. Prática Pneumológica. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2010:160-78.
2. Lamp C. Lavado brônquico, lavado bronco-alveolar, escovado brônquico e biópsia endobrônquica. In: Ernst A. Broncoscopia. Rio de Janeiro: Ed. Revinter Ltda, 2011:129-48.
3. Negri EM, Pedreira Jr WL. Lavado broncoalveolar e biópsia transbrônquica. In: Pedreira Jr WL, Jacomelli M. Broncoscopia diagnóstica e terapêutica. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005:163-74.
4. Islam S, Mathur PN, Finlay G. Flexible bronchoscopy in adults: Overview. UpToDate. 2016. Disponível em: < <http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 18/10/2016.
5. Islam S, Mathur PN, Finlay G. Flexible bronchoscopy in adults: Indications and contraindications. UpToDate. 2016. Disponível em: < <http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 18/10/2016.
6. E King TE, Mathur PN, Hollingsworth H. Basic principles and technique of bronchoalveolar lavage. UpToDate. 2016. Disponível em: < <http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 18/10/2016.
7. Santos CGF, Suzuki I. Anatomia das vias aéreas inferiores. In: Pedreira Jr WL, Jacomelli M. Broncoscopia diagnóstica e terapêutica. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005:163-74.
8. Goldstein RA, Rohatgi PK, Bergofsky EH, Block ER, Daniele RP, Dantzker DR, Davis GS, Hunninghake GW, King TE Jr, Metzger WJ, et al. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. Am Rev Respir Dis. 1990 Aug;142(2):481-6.
9. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, Drent M, Haslam PL, Kim DS, Nagai S, Rottoli P, Saltini C, Selman M, Strange C, Wood

- B;American Thoracic Society Committee on BAL in Interstitial Lung Disease.. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 May 1;185(9):1004-14.
10. Goldstein, R.A.; Rohatgi, P.K.; Bergofsky, E.H.; Block, E.R.; Daniele, R.P.; Dantzker, D.R.; Davis, G.S.; Hunninghake, G.W.; King, T.E., Jr.; Metzger, W.J.; et al. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis*. **1990**, 142, 481–486.
 11. Meyer KC, Raghu G. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful? *Eur Respir J*. 2011 Oct;38(4):761-9.
 12. Meyer KC. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic tool. *Semin Respir Crit Care Med*. 2007 Oct;28(5):546-60.
 13. Reynolds HY. Present status of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2009 Sep;15(5):479-85.
 14. Islam S, Mathur PN, Finlay G. Flexible bronchoscopy in adults: Associated diagnostic and therapeutic procedures. *UpToDate*. 2016. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 18/10/2016.

ANEXO 2

1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (PUC-PR):

 Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR	ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
Elaborado pela Instituição Coparticipante														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA														
Título da Pesquisa: Investigação do lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse														
Pesquisador: ANITA NISHIYAMA														
Área Temática:														
Versão: 4														
CAAE: 16930013.0.0000.0102														
Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia														
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio														
DADOS DO PARECER														
Número do Parecer: 439.881														
Data da Relatoria: 09/10/2013														
Apresentação do Projeto:														
Estudo do lavado bronco-alveolar (LBA) de pacientes com infecção pulmonar, durante o estabelecimento da sepse. Envolverá a imunofenotipagem dos leucócitos presentes, com especial atenção para os TLR (Toll-like receptor) expressos em células NK e a pesquisa de mediadores pró-inflamatórios: IFN-gamma e PAF (platelet activating factor).														
Serão coletadas amostras de 40 participantes divididos em dois grupos, GRUPO I - SIRS com 20 participantes e outros 20 do GRUPO II - Sepse= SIRS + infecção.														
As amostras serão coletadas no Setor de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru. As amostras serão provenientes dos pacientes que preencham os pré-requisitos do guideline para a sepse (Dellinger et al., 2013) adotado pela equipe médica do setor do Hospital Cajuru. Serão coletados LBA dos pacientes selecionados, conforme padronização da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia/ANVISA.														
Critério de Inclusão:														
Presença de SIRS e suspeita de infecção serão os únicos critérios para inclusão.														
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155</td> <td style="width: 33%;">CEP: 80.215-901</td> <td style="width: 33%;"></td> </tr> <tr> <td>Bairro: Prado Velho</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: PR</td> <td>Município: CURITIBA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (41)3271-2292</td> <td>Fax: (41)3271-2292</td> <td>E-mail: nep@pucpr.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155	CEP: 80.215-901		Bairro: Prado Velho			UF: PR	Município: CURITIBA		Telefone: (41)3271-2292	Fax: (41)3271-2292	E-mail: nep@pucpr.br
Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155	CEP: 80.215-901													
Bairro: Prado Velho														
UF: PR	Município: CURITIBA													
Telefone: (41)3271-2292	Fax: (41)3271-2292	E-mail: nep@pucpr.br												



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 439.881

Critério de Exclusão:

Indivíduos imunossuprimidos serão excluídos do grupo de estudo. Por exemplo, câncer, patologias malignas hematológicas, da medula óssea ou transplantados, ou com AIDS bem como aqueles sob tratamento quimioterápico, terapia imunossupressora ou sob uso de esteróides (> 10 mg por dia por mais de 15 dias).

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse. Realizar uma imunofenotipagem das células inflamatórias presentes no lavado bronco-alveolar destes pacientes e analisar o conteúdo de mediadores da inflamação.

Objetivo Secundário:

Objetivos específicos - Investigar a expressão de TLR por células NK obtidas do LBA de pacientes durante a sepse; Determinar 2 importantes mediadores inflamatórios que participam da evolução do quadro de sepse no LBA: IFN-gamma e PAF; Comparar os achados celulares e de mediadores com os obtidos do sangue periférico desses pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos para o paciente são os inerentes ao procedimento da endoscopia respiratória. Ou seja, não há riscos adicionais além dos possíveis para qualquer paciente que não esteja em UTI.

Entre os riscos mais comuns incluem-se sensibilidade do nariz e garganta, hemorragia nasal e tosse com sangue, que normalmente se resolvem sem intervenção. Portanto, os procedimentos de coleta de lavado bronco-alveolar só será realizada em pacientes estáveis e em condições clínicas que preencham os critérios de inclusão.

Benefícios:

Quanto aos benefícios, estes referem-se à coleta do material que vai orientar a antibioticoterapia e realizar o tolete brônquico para melhora dos parâmetros ventilatórios em pacientes em sepse pulmonar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa envolvendo 40 participantes em dois grupos. A pesquisa tem um orçamento de R\$ 25.000,00 e será custeado pelo pesquisa.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901



UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2292

Fax: (41)3271-2292

E-mail: nep@pucpr.br

 PUCPR <small>UNIVERSIDADE PARANAENSE</small>	Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR	ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR	
---	---	---	---

Continuação do Parecer: 439.881

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Os termos são apresentados estão em conformidade a Resolução 466/02.

Recomendações:
sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
O trabalho tem sua relevância não expondo o participante da pesquisa a grandes riscos em contrapartida aos benefícios.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CURITIBA, 30 de Outubro de 2013

Assinador por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155			
Bairro: Prado Velho		CEP: 80.215-901	
UF: PR	Município: CURITIBA		
Telefone: (41)3271-2292	Fax: (41)3271-2292	E-mail: nep@pucpr.br	

Página 03 de 03

2 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (UFPR):

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Investigação do lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse

Pesquisador: ANITA NISHIYAMA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 16930013.0.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 398.997

Data da Relatoria: 11/09/2013

Apresentação do Projeto:

Equipe da pesquisa: Ana Lucia Zanatta, Fernando de Souza Fonseca Guimaraes, Paulo de Souza Fonseca Guimarães, Rodrigo Martinez de Campos.

Investigação do lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse: Avaliação da expressão de TLR por células NK e produção de mediadores pró-inflamatórios. Trata-se de projeto de tese de doutorado do doutorando Paulo de Souza Fonseca Guimarães, com enfoque no lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da

sepse, que pretende avaliar a expressão de TLR por células NK e a produção de mediadores pró-inflamatórios; para tanto, será realizada a imunofenotipagem dos leucócitos presentes, com especial atenção para os TLR (Toll-like receptor) expressos em células NK e a pesquisa de mediadores pró-inflamatórios: IFNgama e PAF.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar o lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse. Realizar uma imunofenotipagem das células inflamatórias presentes no lavado bronco-alveolar destes pacientes e analisar o conteúdo de mediadores da inflamação.

Específicos: Investigar a expressão de TLR por células NK obtidas do LBA de pacientes durante a

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 398.997

sepse;

Determinar 2 importantes mediadores inflamatórios que participam da evolução do quadro de sepse no LBA: IFNgama e PAF; Comparar os achados celulares e de mediadores com os obtidos do sangue periférico desses pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informam que não haverá riscos adicionais além dos possíveis para qualquer paciente que não esteja em UTI. Entre os riscos mais comuns incluem-se sensibilidade do nariz e garganta, hemorragia nasal e tosse com sangue, que normalmente se resolvem sem intervenção. Portanto, os procedimentos de coleta de lavado bronco-alveolar só será realizada em pacientes estáveis e em condições clínicas que

preenchem os critérios de inclusão.

Quanto aos benefícios, estes referem-se à coleta do material que vai orientar a antibioticoterapia e realizar o tolete brônquico para melhora dos parâmetros ventilatórios em pacientes em sepse pulmonar.

Muitos estudos clínicos foram propostos e testados no tratamento da sepse, no entanto, nenhum tratamento tem demonstrado eficácia significativa na prevenção da alta mortalidade dos pacientes até o momento. Com este trabalho, poderíamos identificar precocemente os mediadores inflamatórios no LBA ou marcadores celulares, antes da instalação e progressão da cascata inflamatória que caracteriza o choque séptico. Com isso, seria possível antecipar alguma intervenção, por exemplo, antibioticoterapia ou tratamento com PAF acetil hidrolase (enzima que inativa o PAF) nos pacientes em SIRS para evitar o desenvolvimento da sepsis. Diante deste quadro, consideramos de alta relevância estudar estratégias específicas de prevenção da injúria pulmonar aguda e os seus desdobramentos. A pesquisadora acrescenta que, do ponto de vista científico, o presente estudo contribuirá para elucidar mecanismos celulares do estabelecimento da sepse como base para o desenvolvimento de novas estratégias e procedimentos para minimizar as consequências deste extenso quadro inflamatório.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante pois a sepse é uma das causas mais frequentes de mortalidade em unidades de terapia intensiva (UTI) e resulta na morte de cerca de 30-50% dos pacientes devido à lesão tecidual excessiva.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 398.997

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos exigidos estão apresentados.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 398.997

CURITIBA, 18 de Setembro de 2013

Assinador por:
Claudia Seely Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 3

1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PACIENTE:

Nós, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná e da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, estamos convidando-o para participar de uma pesquisa intitulada: **“Investigação do lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse: Avaliação da expressão de TLR por células NK e produção de mediadores pró-inflamatórios”**.

- a) O sr. (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa, que tem como finalidade investigar o *lavado bronco-alveolar* (material fluido que se coleta durante o exame de endoscopia respiratória) de pacientes com *infecção no trato respiratório* (pneumonia) durante o estabelecimento da *sepse* (quando a infecção se manifesta por todo o organismo, ou seja, quando a infecção está associada à *síndrome da resposta inflamatória sistêmica*). As células inflamatórias presentes no lavado bronco-alveolar serão analisadas através de *imunofenotipagem* (técnica utilizada para identificar qual o tipo exato de célula presente no lavado bronco-alveolar) para estudar o conteúdo de mediadores da inflamação.
- b) Esta pesquisa é direcionada a pacientes oriundos das Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Cajuru, portadores de *síndrome da resposta inflamatória sistêmica* com suspeita ou confirmação de infecção pulmonar associada, com idade acima de 18 anos, e que não possuam *imunossupressão* (doença que afeta a resposta imunológica do organismo às infecções como câncer, patologias malignas hematológicas ou da medula óssea, transplantados, portadores de síndrome da imunodeficiência adquirida, etc.), bem como se estiverem em tratamento quimioterápico, terapia imunossupressora ou em uso crônico de esteroides ou corticoides (> 10mg por dia por mais de 15 dias).
- c) Ao participar deste estudo o sr. (a) permitirá que o pesquisador realize uma *broncoscopia* (um tipo de endoscopia que avalia as vias respiratórias) no Setor de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru para coleta de amostras de lavado bronco-alveolar e de sangue venoso periférico. A qualquer momento, o sr. (a) tem a liberdade de desistir de participar e retirar seu consentimento, sendo que sua recusa não lhe trará nenhum prejuízo em relação com o pesquisador ou com a instituição.
- d) A participação nesta pesquisa não traz complicações legais, sendo os riscos e/ou desconfortos a que o sr. (a) estará exposto (a) referentes a qualquer procedimento de endoscopia respiratória, ou seja, não há riscos adicionais além dos possíveis para qualquer paciente que esteja internado em Unidade de Terapia Intensiva e que necessitem de realização deste exame. Entre os riscos mais comuns incluem-se sensibilidade do nariz e garganta, hemorragia nasal e tosse com sangue, que normalmente se resolvem sem intervenção. Portanto, os procedimentos de coleta de lavado bronco-alveolar só serão realizados em pacientes estáveis e em condições clínicas adequadas para realização do mesmo. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.
- e) Quanto aos benefícios, do ponto de vista científico, a presente pesquisa contribuirá para elucidar os mecanismos celulares do estabelecimento da *síndrome da resposta inflamatória sistêmica* como base para o desenvolvimento de novas estratégias e procedimentos para minimizar as consequências desta

patologia. E, além de contribuir para o avanço científico, a realização da coleta de lavado bronco-alveolar pode auxiliar na escolha adequada do antibiótico para o tratamento de infecções pulmonares e na remoção de secreções pulmonares acumuladas nas vias respiratórias com benefícios imediatos nos parâmetros ventilatórios.

- f) Os pesquisadores Paulo de Souza Fonseca Guimarães (médico do Setor de Endoscopia respiratória do Hospital Cajuru), Marlos de Souza Coelho (Chefe do Serviço de Cirurgia Torácica e Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru), Anita Nishiyama (Pesquisadora do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná), responsáveis por este estudo, poderão ser contatados para esclarecer eventuais dúvidas que sr. (a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Paulo de Souza Fonseca Guimarães

e-mail paulosfguimaraes@gmail.com

telefone: (41) 96817317 ou (41) 32713000

endereço: Hospital Universitário Cajuru, Setor de Endoscopia Respiratória. Av. Sao José, 300. CEP 80050-350 Curitiba, Paraná – PR

Marlos de Souza Coelho

e-mail clinicadotorax@marloscoelho.com.br

telefone: (41) 99740600 ou (41) 32663500

endereço: Hospital Universitário Cajuru, Setor de Endoscopia Respiratória. Av. Sao José, 300. CEP 80050-350 Curitiba, Paraná – PR

Anita Nishiyama

e-mail: anita.ufpr@gmail.com

telefone (41) 99452241 ou (41) 33611707

endereço: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia. Centro Politécnico- Jardim das Américas. CEP 81531-990 Curitiba - PR

- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se o (a) sr. (a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.
- h) Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais e somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito em forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade. E sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do pesquisador.
- i) O sr. (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Eu, _____, portador do RG nº _____, tendo em vista os itens acima apresentados e após ter lido e compreendido o termo acima descrito, manifesto aqui o meu consentimento de forma livre e esclarecida, em participar da pesquisa **“Investigação do lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse: Avaliação da expressão de TLR por células NK e produção de mediadores pró-inflamatórios”**.

Curitiba, ____ de _____ de 2013.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

Assinatura do pesquisador responsável / orientador

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O RESPONSÁVEL LEGAL:

Nós, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná e da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, estamos convidando-o para participar de uma pesquisa intitulada: **“Investigação do lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse: Avaliação da expressão de TLR por células NK e produção de mediadores pró-inflamatórios”**.

- k) O sr. (a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa, que tem como finalidade investigar o *lavado bronco-alveolar* (material fluido que se coleta durante o exame de endoscopia respiratória) de pacientes com *infecção no trato respiratório* (pneumonia) durante o estabelecimento da *sepse* (quando a infecção se manifesta por todo o organismo, ou seja, quando a infecção está associada à *síndrome da resposta inflamatória sistêmica*). As células inflamatórias presentes no lavado bronco-alveolar serão analisadas através de *imunofenotipagem* (técnica utilizada para identificar qual o tipo exato de célula presente no lavado bronco-alveolar) para estudar o conteúdo de mediadores da inflamação.
- l) Esta pesquisa é direcionada a pacientes oriundos das Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Universitário Cajuru, portadores de *síndrome da resposta inflamatória sistêmica* com suspeita ou confirmação de infecção pulmonar associada, com idade acima de 18 anos, e que não possuam *imunossupressão* (doença que afeta a resposta imunológica do organismo às infecções como câncer, patologias malignas hematológicas ou da medula óssea, transplantados, portadores de síndrome da imunodeficiência adquirida, etc.), bem como se estiverem em tratamento quimioterápico, terapia imunossupressora ou em uso crônico de esteroides ou corticoides (> 10mg por dia por mais de 15 dias).
- m) Ao participar deste estudo o sr. (a) permitirá que o pesquisador realize uma *broncoscopia* (um tipo de endoscopia que avalia as vias respiratórias) no Setor de Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru para coleta de amostras de lavado bronco-alveolar e de sangue venoso periférico. A qualquer momento, o sr. (a) tem a liberdade de desistir de participar e retirar seu consentimento, sendo que sua recusa não lhe trará nenhum prejuízo em relação com o pesquisador ou com a instituição.
- n) A participação nesta pesquisa não traz complicações legais, sendo os riscos e/ou desconfortos a que o sr. (a) estará exposto (a) referentes a qualquer procedimento de endoscopia respiratória, ou seja, não há riscos adicionais além dos possíveis para qualquer paciente que esteja internado em Unidade de Terapia Intensiva e que necessitem de realização deste exame. Entre os riscos mais comuns incluem-se sensibilidade do nariz e garganta, hemorragia nasal e tosse com sangue, que normalmente se resolvem sem intervenção. Portanto, os procedimentos de coleta de lavado bronco-alveolar só serão realizados em pacientes estáveis e em condições clínicas adequadas para realização do mesmo. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.
- o) Quanto aos benefícios, do ponto de vista científico, a presente pesquisa contribuirá para elucidar os mecanismos celulares do estabelecimento da *síndrome da resposta inflamatória sistêmica* como base para o desenvolvimento

de novas estratégias e procedimentos para minimizar as consequências desta patologia. E, além de contribuir para o avanço científico, a realização da coleta de lavado bronco-alveolar pode auxiliar na escolha adequada do antibiótico para o tratamento de infecções pulmonares e na remoção de secreções pulmonares acumuladas nas vias respiratórias com benefícios imediatos nos parâmetros ventilatórios.

- p) Os pesquisadores Paulo de Souza Fonseca Guimarães (médico do Setor de Endoscopia respiratória do Hospital Cajuru), Marlos de Souza Coelho (Chefe do Serviço de Cirurgia Torácica e Endoscopia Respiratória do Hospital Universitário Cajuru), Anita Nishiyama (Pesquisadora do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná), responsáveis por este estudo, poderão ser contatados para esclarecer eventuais dúvidas que sr. (a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Paulo de Souza Fonseca Guimarães

e-mail paulosfguimaraes@gmail.com

telefone: (41) 96817317 ou (41) 32713000

endereço: Hospital Universitário Cajuru, Setor de Endoscopia Respiratória. Av. Sao José, 300. CEP 80050-350 Curitiba, Paraná – PR

Marlos de Souza Coelho

e-mail clinicadotorax@marloscoelho.com.br

telefone: (41) 99740600 ou (41) 32663500

endereço: Hospital Universitário Cajuru, Setor de Endoscopia Respiratória. Av. Sao José, 300. CEP 80050-350 Curitiba, Paraná – PR

Anita Nishiyama

e-mail: anita.ufpr@gmail.com

telefone (41) 99452241 ou (41) 33611707

endereço: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia. Centro Politécnico- Jardim das Américas. CEP 81531-990 Curitiba - PR

- q) A sua participação neste estudo é voluntária e se o (a) sr. (a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.
- r) Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais e somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito em forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade. E sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do pesquisador.
- s) O sr. (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.
- t) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Eu, _____, portador do RG nº _____, tendo em vista os itens acima apresentados e após ter lido e compreendido o termo acima descrito, manifesto aqui o meu consentimento de forma livre e esclarecida, em participar da pesquisa **“Investigação do lavado bronco-alveolar de pacientes com infecção no trato respiratório durante o estabelecimento da sepse: Avaliação da expressão de TLR por células NK e produção de mediadores pró-inflamatórios”**.

Curitiba, ____ de _____ de 2013.

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador

Assinatura do pesquisador responsável / orientador

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 4 – PROTOCOLO DE TRATAMENTO DA SEPSE

- III. Pacientes com SABA e $PaO_2/FiO_2 < 150$ mmHg se beneficiam de VM em posição PRONA. Estes pacientes também se beneficiam do uso de BNM por até 48 h;
- IV. Os pacientes sob VM devem manter a cabeceira do leito entre 30-45 graus (se não houver contra-indicação) para prevenir PAV;
- V. Retire o paciente da VM assim que ela não for mais necessária. Sempre que possível, tente uma ventilação não-invasiva como alternativa à VM. Institua protocolos de desmame;
- **Suporte renal**
 - I. Terapias de substituição renal não devem ser iniciadas sem uma clara indicação (hipervolemia, azotemia, hiperpotassemia, acidose grave);
 - II. As terapias de substituição renal contínuas e intermitentes são equivalentes em pacientes com sepsis ou choque séptico e insuficiência renal;
 - III. O uso de terapias contínuas facilita o balanço hídrico de pacientes hemodinamicamente instáveis.
- **7. Tratamentos adicionais**
 - **Hiperglicemia**
 - I. Se após a estabilização inicial o paciente tiver 2 glicemias consecutivas acima de 180 mg/dl, inicie insulina endovenosa contínua para mantê-la abaixo de 180 mg/dl. Evite hipoglicemia;
 - II. Monitorização frequente será necessária, geralmente a cada 1-2 horas até a estabilização desejada, depois a cada 2-4 horas. Cheque frequentemente a acurácia da glicemia capilar com a glicemia sanguínea.
 - **Uso de hemocomponentes**
 - I. Após a fase de ressuscitação hemodinâmica, quando o paciente já estiver estável e bem perfundido (lactato "normalizado" e/ou SvO₂ $\geq 70\%$), a hemoglobina (Hgb) pode ser mantida até um patamar mínimo de 7 mg/dl sem necessidade de transfusão adicional. Pacientes com toquemia miocárdica, hipovolemia grave ou hemorragia aguda necessitam de níveis mais elevados de Hgb (ao redor de 9 mg/dl);
 - II. Pacientes sépticos só devem receber plaquetas rotineiramente se a contagem estiver abaixo de 10.000/mm³ (ou 20.000/mm³ se o paciente tiver alto risco de sangramento). Antes de procedimentos invasivos ou cirurgias, as plaquetas devem ser mantidas acima de 50.000-80.000/mm³;
 - III. Os pacientes não devem receber plasma fresco com o intuito de corrigir anormalidades da coagulação na ausência de sangramento ou de procedimentos invasivos.
 - **Sedação, analgesia e BNM**
 - I. Os pacientes sépticos devem ser mantidos com sedação leve a moderada para controle da dor, ansiedade e agitação. Um protocolo para manutenção e descontinuação intermitente das drogas deve ser instituído.
 - II. BNM devem ser evitados ou usados intermitentemente quando estritamente necessários.

- **Profilaxia de TVP e HDA**
 - I. Todos os pacientes sépticos devem receber profilaxia para TVP.
 - II. A profilaxia para TVP pode ser farmacológica (com heparina regular ou de baixo peso molecular) ou não-farmacológica (a terapia combinada deve ser usada sempre que possível);
 - III. A profilaxia para HDA pode ser feita com bloqueador H2 ou bloqueador da bomba de prótons e somente para pacientes com risco de sangramento (hipoperfusão, ventilação mecânica, coagulopatia, sangramento digestivo ou doença péptica prévios, etc.).
- **Terapia nutricional**
 - I. Todos os pacientes sépticos devem ter seu suporte nutricional iniciado após a ressuscitação hemodinâmica inicial. Idealmente, nutrição enteral precoce deve ser o padrão para todos os pacientes;
 - II. Evite aporte calórico nos primeiros dias e avance conforme a tolerância.

- **8. Monitorização das disfunções orgânicas:**
 - I. Inicie e mantenha os suportes necessários às disfunções orgânicas pelo menor tempo necessário para minimizar complicações;
 - II. Monitorize as disfunções orgânicas clinicamente e através de índices (SOFA, por exemplo) para avaliar a evolução clínica e a resposta terapêutica;
 - III. Considere as limitações de suporte dentro do prognóstico de cada paciente.

Escore SOFA: Sanguine/Orgão Tabular Assessment					
SOFA	Score	1	2	3	4
Respiratório	0-4	0-1	2	3	4
Coagulatório	0-6	0-1	2	3	4
Cardiovascular	0-4	0-1	2	3	4
Neuronal	0-4	0-1	2	3	4
Renal	0-3	0-1	2	3	4
Hepático	0-3	0-1	2	3	4
Imunológico	0-3	0-1	2	3	4
Endócrino	0-3	0-1	2	3	4
Órgão 7 (alto urinário)	0-3	0-1	2	3	4
Órgão 8 (baixo urinário)	0-3	0-1	2	3	4
Órgão 9 (sistema digestivo)	0-3	0-1	2	3	4

Referências principais: 1. Rhodes A, Evans L, and Zarobek Sepsis Campaign Guidelines Committee. Critical Care Medicine 2017; 44(1):444-452. 2. Singer M et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016; 315(8):762-774.

Atualizado Abril/2017



POTSS 4.0

Programa de Otimização do Tratamento da Síndrome Séptica IV

Os 8 passos principais do POTSS:

1. **Identifique o paciente como portador de Sepsis ou Choque Séptico:**
 - Sepsis é definida como "Disfunção orgânica que ameaça a vida devido a uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção".
 - Choque Séptico é um "Subgrupo dos pacientes com Sepsis que possui graves anormalidades circulatórias e do metabolismo celular que acarretam substancial aumento na mortalidade".
 - São os seguintes os critérios para identificar um paciente adulto como portador de Sepsis ou Choque Séptico:
 - I. Evidência clínica de infecção com foco suspeito ou confirmado.
 - II. Disfunção de pelo menos 1 órgão/sistema nas últimas 24 horas com elevação de 2 ou mais pontos no SOFA (veja tabela no final).
 - III. Pacientes com os dois critérios acima têm Sepsis. Se o paciente com Sepsis tiver hipotensão arterial dependente de vasopressor, mesmo após a reposição inicial de volume, e hiperlactatemia ≥ 2 mmol/L, ele tem Choque Séptico.
- Sepsis e Choque Séptico são emergências médicas e o tratamento deve ser iniciado imediatamente. Portanto, na prática, sempre que um paciente tiver uma suspeita clínica razoável de infecção, avalie rapidamente os 6 principais órgãos e sistemas:
- a) Cérebro (SNC): qualquer diminuição do nível de consciência;
- b) Pulmão (Sistema Respiratório): taquipneia, dispneia e/ou qualquer diminuição significativa da oxigenação arterial;
- c) Coração (Sistema Cardiovascular): hipotensão arterial;
- d) Fígado: icterícia, elevação das bilirrubinas;
- e) Rins: oligúria e/ou elevação da creatinina;
- f) Sangue (Coagulação): queda das plaquetas.
- A presença de qualquer uma dessas disfunções (desde que não possa ser claramente explicada por outro razão) deve significar disfunção de órgão pela infecção e o paciente tem sepsis até prova em contrário. Assim, enquanto o paciente é submetido a mais exames para definir as características da infecção e das disfunções orgânicas, proceda rapidamente os passos 2, 3 e 4 concomitantemente.

2. Após garantir o ABC primário das emergências médicas, obtenha um acesso venoso para coleta de sangue e administração de volume e solicite os exames de imagem:

- I. Certifique-se que o paciente tenha um bom acesso venoso para coleta de exames e administração de volume;
- II. Coleta amostras de sangue necessárias para o diagnóstico da sepsé, das disfunções orgânicas e monitore conforme a necessidade ao longo do tempo (exames de rotina sugeridos: hemograma com plaquetas, bioquímica, bilirrubinas, gaseometria arterial e LACTATO);
- III. Coleta pelo menos duas amostras de sangue para hemoculturas, desde que isso não atrase o início do antibiótico. Pelo menos uma das hemoculturas deve ser colhida percutânea; se houver acesso(s) vascular(es) por mais de 48 horas, coleta uma outra amostra através de cada um dos cateteres. Se houver indicação, coleta culturas de outras fontes;
- IV. Tenha um parâmetro de perfusão desde o início do tratamento e acompanhe sua evolução ao longo do tempo: obtenha um valor do LACTATO sérico no momento do diagnóstico da sepsé e acompanhe sua evolução seriada ao longo do tempo (tipicamente a cada 2 h nas primeiras 6 h);
- V. Solicite os exames de imagem (radiologia, tomografia, ecografia) necessários para caracterizar a infecção, sem perder tempo para os passos 3 e 4.

3. Inicie a ressuscitação hemodinâmica rapidamente:

- I. Administre rapidamente a administração de 30 ml/kg de cristalóide, que devem ser dados em no máximo 3 horas. A grande maioria dos pacientes com Sepsé têm hipoperfusão oculta ou expressa e esta administração inicial de fluidos está claramente associada com melhor prognóstico. A única exceção são os pacientes com clara evidência de congestão pulmonar.
- II. Administração adicional de fluidos depende de reavaliações frequentes (veja passo 5).
- III. Tenha por objetivo uma PAM ≥ 65 mmHg. Se necessário, inicie vasopressor (geralmente noradrenalina 0,1-2 mcg/Kg/min) junto com a administração de cristalóide.
- IV. Pacientes com necessidade de droga vasoativa devem ter acesso venoso central e acesso arterial para pressão arterial média (PAM). Esses procedimentos devem ser instituídos tão logo quanto possível, mas não podem atrasar o início da reposição de fluidos, da administração de vasopressores e do antibiótico.

4. Administre o(s) antimicrobiano(s) dentro da 1ª hora do diagnóstico provável de Sepsé ou Choque Séptico e controle o foco:

- I. Os antimicrobianos devem ser iniciados rapidamente após a identificação do paciente com provável Sepsé ou Choque Séptico dentro de no máximo 1 hora deste diagnóstico. Vários estudos mostram que uma escolha adequada neste momento é

fundamental para diminuir a mortalidade. Não aguarde confirmar o diagnóstico porque isso poderá retardar o início do antibiótico (se a infecção não for confirmada após algumas horas com outros exames, suspenda imediatamente o antibiótico).

- II. Inicie antibióticos de largo espectro com boa penetração no foco infeccioso para cobrir a grande maioria dos patógenos prováveis pela infecção, baseado no foco primário e na epidemiologia do paciente para bactérias multirresistentes ou não. Selecione um esquema combinado de antimicrobianos quando o paciente estiver muito grave, neutropênico ou com suspeita de infecção por bactérias resistentes a múltiplas drogas (bactérias RMD);
- III. Os antimicrobianos devem ter a dose e a administração adequadas para a penetração tecidual no foco infeccioso e respeitadas os princípios de farmacodinâmica e farmacodinâmica das drogas;
- IV. Pacientes com suspeita de influenza grave devem receber oseltamivir desde as 1as horas da suspeita clínica.

5. Otimização hemodinâmica e antimicrobiana

• Fluidos

- I. A administração de volume se compõe de 4 grandes fases: resgate, otimização, estabilização e descalonamento. Após a fase de resgate inicial, com a administração de 30 ml/kg de cristalóide, entramos na fase de otimização e estabilização.

- II. Avalie clinicamente a necessidade de mais volume baseado inicialmente em dados clínicos (FC, PAM, débito urinário, nível de consciência, perfusão da pele, lactato sérico). Pacientes nitidamente hipovolêmicos, mal perfundidos e sem sinais de congestão pulmonar, devem receber mais volume rapidamente (bolus adicionais de 500-1000 ml). Pacientes com correção dos sinais clínicos de hipovolemia e hipoperfusão ou com sinais de congestão pulmonar, não devem receber mais volume nesta fase.
- III. Pacientes com sinais clínicos menos evidentes que os definidos no item II, podem se beneficiar de provas dinâmicas e/ou de ecografia na beira-do-leito para definir fluido-responsividade e receber ou não bolus adicionais de volume.
- IV. Cristalóides são a forma preferencial de fluido. Albumina é alternativa eventual, especialmente em pacientes com hipobalbuminemia ou hepatopatia. Não usar gelatinas ou amidos.

• Drogas Vasoativas (DVA)

- I. Noradrenalina (0,1-2 mcg/Kg/min) é a DVA de preferência. Ela deve ser administrada desde a fase inicial, se houver hipotensão arterial, com o objetivo de manter a PAM ≥ 65 mmHg. Pacientes com doença cardíaca isquêmica, isquemia cerebral aguda ou história de HAS não controlada podem necessitar de PAM mais elevada.
- II. Se o uso de noradrenalina não for suficiente para elevar a PAM, pode-se acrescentar vasopressina (0,03-0,06U/min) ou adrenalina (0,1-2,0 mcg/Kg/min)

• Perfusão

- I. O objetivo da otimização hemodinâmica com fluidos e vasopressores é corrigir a hipoperfusão sistêmica. Dados clínicos favoráveis são queda da FC, elevação da PAM, normalização do débito urinário e da perfusão da pele e melhora do nível de consciência.

- II. A hiperlactatemia na fase inicial da sepsé e do Choque Séptico geralmente significa hipoperfusão. A queda contínua do lactato sérico e sua normalização deve ser o objetivo nas primeiras 12-24 horas do tratamento;

- III. Se, após as medidas anteriores, o paciente ainda apresentar sinais de hipoperfusão, pode-se acrescentar dobutamina (5-10 mcg/Kg/min);

- IV. Pacientes que permanecem dependentes de vasopressores e com hipoperfusão após algumas horas de tratamento podem receber corticóide (hidrocortisona 200-300 mg/dia divididos em 4 a 6 doses/dia).

- V. Pacientes que permanecem dependentes de DVA e com hipoperfusão após algumas poucas horas podem se beneficiar de hipertensão hemodinâmica invasiva e/ou não-invasiva do débito cardíaco e das variáveis de oxigenação.

• Antimicrobianos

- I. Reavale o esquema antimicrobiano inicial após 48-72 horas com o resultado das culturas e estreite o espectro (descalonamento), sempre que possível, para minimizar toxicidade, custos e desenvolvimento de resistências. Terapia combinada não necessita ser administrada por mais de 3-5 dias;

- II. Logo após a ressuscitação inicial, estabeleça o controle do foco de infecção (drenagem de abscessos, desbridamento de tecidos inválveis, remoção de cateteres potencialmente infectados, etc.);

- III. A duração típica de um tratamento deve ser 7-10 dias. Esporadicamente, prolongue até 10-14 dias se a resposta for lenta, se houver focos não drenados de infecção, infecções comprovadas por S. aureus, infecções de resolução lenta ou pacientes imunodeprimidos;

- VIII. Procalcitonina (ou proteína C reativa) baixa ou em queda ajuda o médico a suspender ou encurtar o tempo de tratamento dos antimicrobianos.

6. Suporte às disfunções orgânicas

• Ventilação Mecânica

- I. Evite elevados volumes correntes (VC) e altas pressões de plateau (Pplat) em todos os pacientes, com ou sem SARA, ajuste o VC para cerca de 6 ml/Kg e mantenha a Pplat < 30 cmH₂O. Pacientes com baixa complacência torácica (hipertensão abdominal, grandes derrames pleurais, etc.) podem tolerar níveis mais elevados de

ANEXO 5 - PROTOCOLO CITOMETRIA DE FLUXO

AMOSTRA SANGUE:

- Centrifugar a amostra (nos tubos de coleta) por 10 min, a 1500 RPM, T.A.
- Pipetar o plasma e distribuir em microtubos.
- Congelar os microtubos no freezer -80°C.
- Homogeneizar o tubo contendo o sangue.
- Distribuir 200 µL de sangue em cada tubo de citometria (marcação de membrana).
- Distribuir 300 µL de sangue em cada tubo de citometria (marcação intracelular).
- Citometria (**marcação de membrana**):
 - Centrifugar por 5 min, a 1500 RPM, T.A.
 - Incubar as células com os marcadores (**exceto o 7-AAD e os marcadores intracelulares**) por 30 min. a T.A.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	0,5 µL CD3	0,5 µL CD56	0,5 µL 7-AAD	0,5 µL Cont. isot.
2	0,5 µL CD4	0,5 µL CD8	0,5 µL 7-AAD	0,5 µL CD3
3	0,5 µL CD19	0,5 µL CD20	0,5 µL 7-AAD	---
4	0,5 µL CD3	0,5 µL CD56	0,5 µL 7-AAD	1,0 µL Perforina
5	0,5 µL CD3	0,5 µL CD56	0,5 µL 7-AAD	0,5 µL Cont. isot.

- ✓ Marcação de superfície: Tubos 1 a 3. Tubos 4 e 5 apenas os marcadores conjugados com FITC e PE.
- ✓ Marcação intracelular: Tubos 4 e 5 (apenas Perforina e controle isotópico APC).
- **Lise das amostras (tubos 1 a 3):** Geralmente 1 ou 2x!!!
 - Adicionar 4,5 mL de tampão de lise ACK em cada tubo.
 - Homogeneizar.
 - Incubar por 5 min.
 - Centrifugar por 5 min, a 1500 RPM, T.A.
 - Lavar os tubos uma vez com 1 mL de PBS por 5 min, a 1500 RPM, T.A.
- Citometria (**viabilidade celular - tubos 1 a 3**):
 - Os tubos 1 a 3 serão incubados com 0,5 µL do corante 7-AAD por 20 min. a T.A.

- Lavar uma vez com 500 µL de PBS a 1500 RPM por 5 min, T.A.
- Ressuspender em 300 µL de PBS
- **Citometria (marcação intracelular - tubos 4 e 5 - perforina e controle isotópico APC):**
 - Lavar uma vez os tubos 4 e 5 com 500 µL de PBS a 1500 RPM por 5 min, T.A.
 - Adicionar 100 µL de *Fix & Perm Medium A* por 15 min, T.A., no escuro.
 - Adicionar 2 mL de PBS e centrifugar por 5 min. a 1500 RPM.
 - Adicionar 100 µL de *Fix & Perm Medium B* + marcadores intracelulares nos volumes indicados por 20 min, T.A., no escuro.
 - Adicionar 500 µL de PBS e centrifugar por 5 min. a 1500 RPM.
- **Citometria (viabilidade celular - tubos 4 e 5):**
 - Os tubos 4 e 5 serão incubados com 0,5 µL do corante 7-AAD por 20 min. a T.A.
 - Lavar uma vez com 500 µL de PBS a 1500 RPM por 5 min, T.A.
 - Ressuspender em 300 µL de PBS.

AMOSTRA LBA:

- Transferir a amostra para 2 tubos de 50 mL.
- Centrifugar por 10 min, a 1500 RPM, T.A.
- Pipetar 3 mL do sobrenadante de um dos tubos e distribuir em microtubos.
- Congelar os microtubos no freezer -80°C.
- Homogeneizar com a pipeta.
- Filtrar em *cell strainer* de 100 µm.
- Contar na câmara de Neubauer.
- Centrifugar por 10 min, a 1500 RPM, T.A.
- Ressuspender o pellet em PBS (conforme o nº de células totais do LBA).
- Distribuir nos tubos de citometria (2x10⁶ células/tubo).
- **Citometria (marcação de membrana):**
 - Centrifugar por 5 min, a 1500 RPM, T.A.
 - Bloqueio Fc: 1 µL de Human TruStain FcX, 10 min. a T.A.
 - Incubar as células com os marcadores (**exceto o 7-AAD e os marcadores intracelulares**) por 30 min. a T.A.

Tubo	FITC	PE	PerCP	APC
1	0,5 µL CD3	0,5 µL CD56	0,5 µL 7-AAD	0,5 µL Cont. isot.
2	0,5 µL CD4	0,5 µL CD8	0,5 µL 7-AAD	0,5 µL CD3
3	0,5 µL CD19	0,5 µL CD20	0,5 µL 7-AAD	---
4	0,5 µL CD3	0,5 µL CD56	0,5 µL 7-AAD	1,0 µL Perforina
5	0,5 µL CD3	0,5 µL CD56	0,5 µL 7-AAD	0,5 µL Cont. isot.

- ✓ Marcação de superfície: Tubos 1 a 3. Tubos 4 e 5 apenas os marcadores conjugados com FITC e PE.
- ✓ Marcação intracelular: Tubos 4 e 5 (apenas Perforina e controle isotópico APC).

- Lavar os tubos uma vez com 500 µL de PBS a 1500 RPM, 5 min.
- Citometria (**viabilidade celular - tubos 1 a 3**):
 - Os tubos serão incubados com 0,5 µL do corante 7-AAD por 20 min. a T.A.
 - Lavar uma vez com 500 µL de PBS a 1500 RPM por 5 min. a T.A.
 - Ressuspender os tubos em 300 µL de PBS.
- Citometria (**marcação intracelular - tubos 4 e 5, perforina e controle isotópico APC**):
 - Adicionar 100 µL de *Fix & Perm Medium A* por 15 min, T.A., no escuro.
 - Adicionar 2 mL de PBS e centrifugar por 5 min. a 1500 RPM.
 - Adicionar 100 µL de *Fix & Perm Medium B* + marcadores intracelulares nos volumes indicados por 20 min, T.A., no escuro.
 - Adicionar 500 µL de PBS e centrifugar por 5 min. a 1500 RPM.
- Citometria (**viabilidade celular - tubos 4 e 5**):
 - Os tubos 4 a 5 serão incubados com 0,5 µL do corante 7-AAD por 20 min. a T.A.
 - Lavar uma vez com 500 µL de PBS a 1500 RPM por 5 min, T.A.
 - Ressuspender em 300 µL de PBS.
- **Lise das amostras (tubos 4 e 5):** **** Após marcação intracelular, somente se necessário
 - Adicionar 2 mL de tampão de lise ACK em cada tubo.
 - Homogeneizar.
 - Incubar por 5 min.
 - Centrifugar por 5 min, a 1500 RPM, T.A.
 - Lavar os tubos uma vez com 1 mL de PBS por 5 min, a 1500 RPM, T.A.

ANEXO 6 – ARTIGO PUBLICADO



International Journal of

Molecular Sciences

Article

Natural Killer Cell Assessment in Peripheral Circulation and Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Severe Sepsis: A Case Control Study

Paulo Souza-Fonseca-Guimaraes ^{1,2}, Fernando Guimaraes ³, Caroline Natânia De Souza-Araujo ³, Lidiane Maria Boldrini Leite ⁴, Alexandra Cristina Senegaglia ⁴, Anita Nishiyama ^{2,*,†} and Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes ^{5,6,*,†}

¹ Hospital Universitário Cajuru—Pontifícia Universidade Católica do Paraná—Curitiba PR, Curitiba, Paraná CEP 80050-350, Brazil; paulosfguimaraes@gmail.com

² Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná CEP 81531-990, Brazil

³ Hospital da Mulher “Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti”—CAISM, University of Campinas, São Paulo CEP 13083-887, Brazil; fernando@caism.unicamp.br (F.G.); caroline.natania@yahoo.com.br (C.N.D.S.-A.)

⁴ Núcleo de Tecnologia Celular—Pontifícia Universidade Católica do Paraná—Curitiba PR, Curitiba, Paraná CEP 80215-901, Brazil; lidiane.leite@pucpr.br (L.M.B.L.); alexandra.senegaglia@pucpr.br (A.C.S.)

⁵ Faculty of Medicine, Dentistry and Health Sciences, University of Melbourne, Melbourne, Victoria 3010, Australia

⁶ Division of Molecular Immunology, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research and Department of Medical Biology, University of Melbourne, Parkville 3052, Australia

* Correspondence: anita.ufpr@gmail.com (A.N.); guimaraes.f@wehi.edu.au (F.S.-F.-G.); Tel.: +55-(41)-3361-1707 (A.N.); +61-3-9347-0852 (F.S.-F.-G.)

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editors: Nicholas Huntington and Sam Kung

Received: 3 February 2017; Accepted: 7 March 2017; Published: 12 March 2017

Abstract: Sepsis is a complex systemic inflammatory syndrome, the most common cause of which is attributed to systemic underlying bacterial infection. The complete mechanisms of the dynamic pro- and anti-inflammatory processes underlying the pathophysiology of sepsis remain poorly understood. Natural killer (NK) cells play a crucial role in the pathophysiology of sepsis, leading to exaggerated inflammation due their rapid response and production of pro-inflammatory cytokines such as interferon gamma (IFN- γ). Several studies have already shown that NK cells undergo lymphopenia in the peripheral blood of patients with sepsis. However, our understanding of the mechanisms behind its cellular trafficking and its role in disease development is restricted to studies in animal models. In this study, we aimed to compare the human NK cell subset (CD56^{bright} or ^{dim}) levels in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of sepsis patients. We conducted a case-control study with a sample size consisting of 10 control patients and 23 sepsis patients enrolled at the Hospital Cajuru (Curitiba/PR, Brazil) from 2013 to 2015. Although we were able to confirm previous observations of peripheral blood lymphopenia, no significant differences were detected in NK cell levels in the BAL fluid of these patients. Overall, these findings strengthened the evidence that peripheral blood lymphopenia is likely to be associated with cell death as a consequence of sepsis.

Keywords: natural killer (NK) cells; lung sepsis; lymphopenia; bronchoalveolar lavage (BAL)

Introduction

Sepsis is defined as life-threatening organ dysfunction caused by dysregulated host responses to infection (as per the Third International Consensus definition for sepsis and septic shock) [1,2]. Currently, sepsis is the tenth leading cause of death in high-income countries, accounting for more than 210,000 annual deaths in the USA [3]. With an increasing incidence of sepsis of approximately 9% each year and an increasing emergence of antibiotic resistance in microorganisms, which worsens the efficacy of antibiotic treatment against sepsis [3,4], it is of great urgency to develop a more targeted and efficient treatment strategy against sepsis. Sepsis is defined as the development of two or more symptoms of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) including abnormal thermal regulation, atypical leukocyte count, tachycardia and rapid breathing [5,6]. Left untreated, sepsis may progress to severe sepsis with the development of further complications such as multiple organ failure (MOF) [6]. These patients have an increased risk of subsequently advancing into septic shock—a state of persistent hypotension despite intravenous fluid resuscitation due to acute circulatory failure. Both MOF and septic shock lead to eventual death [5,6]. Despite being extensively studied, the pathogenesis of sepsis and the contribution of cellular mediators of the inflammatory response remain poorly understood.

Recent studies have revealed that the pathogenesis of sepsis is not merely a result of an exacerbated host inflammatory response in an attempt to clear invading pathogens. Combined dysregulation of both pro- and anti-inflammatory responses of the host results in an overzealous release of cytokines and chemokines known as the “cytokine storm”, resulting in the initial stage of SIRS [7–9]. Although a localized inflammatory response is needed for the clearance of infection, failure of anti-inflammatory mediators to control the inflammatory process can lead to endothelial dysfunction allowing further invasion of pathogens into host organs [6]. In addition, patients surviving the initial SIRS stage were discovered to frequently enter an immunosuppressive state during the later stage of sepsis, described as a compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) [10,11]. CARS is a consequence of the body’s initial pro-inflammatory immune state during sepsis, leading to a defective adaptive immune response rendering patients susceptible to secondary nosocomial infections responsible for their death [12].

The innate immune system is a key player in the early stages of sepsis and various studies have focused on the role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of sepsis [13]. Natural killer (NK) cells were initially described as innate lymphocytes with the ability to induce targeted cell death in tumor cells and virus-infected cells by secreting granzymes (Grz) and perforin (PFP) [14–16]. The action of NK cells is regulated via activating and inhibitory receptors, which further divide NK cells into different subtypes with different effector functions which have not yet been completely described [17]. Apart from mediating cytotoxicity, NK cells have also been shown to have regulatory functions on inflammation due to their ability to engage in reciprocal crosstalk with other immune cells such as dendritic cells which provide the cytokine microenvironment required for NK cell functions. This crosstalk is crucial in determining the response of NK cells, which subsequently act on the development of the downstream immune response against infection by suppressing or amplifying inflammation. NK cells produce an array of cytokines such as IFN- γ , GM-CSF and TNF- α and chemokines such as CCL1, CCL2 and CCL5, which contribute to pathogen clearance but also amplify the inflammatory response [17,18]. In addition, recent discoveries have implicated the contribution of NK cells in the pathogenesis of sepsis due to their expression of innate sensors against pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs), enabling them to directly recognize and respond to various pathogens [14,17].

Clinical research has identified that the number of circulating NK cells in the bloodstream correlates inversely with patient survival, with significantly lower circulating NK cell numbers in survivors of sepsis [19]. Additionally, the depletion or priming deficiency of NK cells in experimental murine models of sepsis conferred greater survival benefits against sepsis [20–22]. This evidence strongly suggests that NK cells participate in sepsis, and their circulating levels may be a biomarker of mortality. The molecular mechanism by which NK cells participate in the pathogenesis of sepsis has not been fully elucidated, and whether peripheral blood lymphopenia is linked to a rise in NK

cell levels in the infection sites has not been studied in patients. Here, we aimed to further study NK cell-related lymphopenia with their respective levels in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of lungs of infected patients maintained in the intensive care unit (ICU), and observed for the first time that the lymphopenia in peripheral blood is not associated with increased NK cell levels in the BAL fluid.

1. Results

1.1. Patients Characteristics

Twenty-three patients who were characterized as having severe sepsis had evidence of primary infection in the lungs, and displayed clinical criteria of sepsis (fever or hypothermia, tachycardia (heart rate > 90 bpm), tachypnea (respiratory rate > 20 bpm), leukocytosis (> 12,000) or leukopenia (< 4000), BA stenosis (> 10%)), or an increased sequential organ failure assessment (SOFA) score (two points or more) associated with radiographic imaging identified by tomography and/or thorax radiography, suggesting pulmonary damage due to infection. Patient characteristics are described in Table 1. Healthy controls were patients who have previously undergone or have a currently established tracheostomy, consisting of 10 trauma survivor patients (e.g., following a cerebrovascular accident, cranioencephalic trauma, or polytrauma). These patients had prolonged orotracheal intubation until complete recovery, and displayed no symptoms of infection/pneumonia or lung damage during the biopsy sampling. Although healthy controls were subjected to peripheral blood and BAL fluid sampling, most of the parameters displayed by these patients were not applicable for these controls. The sepsis patients have all undergone mechanical ventilation and most had evidence of primary infection in the lungs (82.61% with confirmed infection from the tracheal aspirate). Fifteen patients had Gram-negative bacterial infections, while two displayed Gram-positive bacterial infections, and three had fungal infections and three had undetermined microbial infections.

Table 1. Parameters of the studied patients.

Parameter	Controls (n = 10)	Sepsis (n = 23)
Age mean (SD)	49.4 (22.6)	59.17 (17.02)
Gender, n (%)		
Male	8 (80%)	16 (69.57%)
Female	2 (20%)	7 (30.43%)
Body mass index, kg/m ² , mean (SD)	28.13 (2.48)	26.14 (4.61)
Comorbidity, n (%)		14 (60.86%)
Hemorrhagic cerebrovascular accident	N/A	4 (17.39%)
Other cerebrovascular accident (ischemia, or aneurysm)	4 (40%)	3 (13.04%)
COPD	N/A	1 (4.35%)
Cancer	N/A	1 (4.35%)
Lung	N/A	4 (17.39%)
Liver failure	N/A	1 (4.35%)
Skull/spine fracture	N/A	4 (17.39%)
Polytrauma	6 (60%)	4 (17.39%)
Mechanic ventilation	N/A	23 (100%)
Infection site		
Urinary tract	N/A	10 (43.48%)
Tracheal aspirate	N/A	19 (82.61%)
Mechanic ventilation	N/A	23 (100%)
Leukocytes, %/mm ³ , mean (SD)	N/A	15,059.56 (10424.43)
SOFA, mean (SD)	N/A	5.43 (2.27)
SAPS II, mean (SD)	N/A	21 (9.95)
Length of stay in hospital, days, means (SD)	N/A	39.82 (21.21)
Length of stay in ICU, days, mean (SD)	N/A	18.78 (9.96)
In-hospital mortality number (%)	N/A	7 (30.43%)
Gram-positive bacteria (%)	N/A	2 (8.69%)
Gram-negative bacteria (%)	N/A	15 (65.21%)
Fungus	N/A	3 (13.04%)
Undetermined microbial infection	N/A	3 (13.04%)

COPD, chronic obstructive airways disease; N/A, not applicable, SOFA, sequential organ failure assessment; SAPS, simplified acute physiology score.

1.2. Pro-Inflammatory Cytokine Profiling in Bronchoalveolar Lavage (BAL) Fluid Samples after Sepsis

Multiple cytokine patterns were associated with a systemic response in sepsis [23]. To characterize the pro-inflammatory cytokine content in the BAL fluid and in peripheral blood, we screened the

samples with a customized Th1/Th2 cytokine detection array. Consistent with previous studies [24], IL-6 was significantly upregulated in the plasma samples from sepsis patients, as well as in the BAL fluid samples, while minimal and insignificant detection of IL-2 and IL-4 was observed (Figure 1). In contrast, we failed to observe a significant increase in other pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α in these clinical settings.

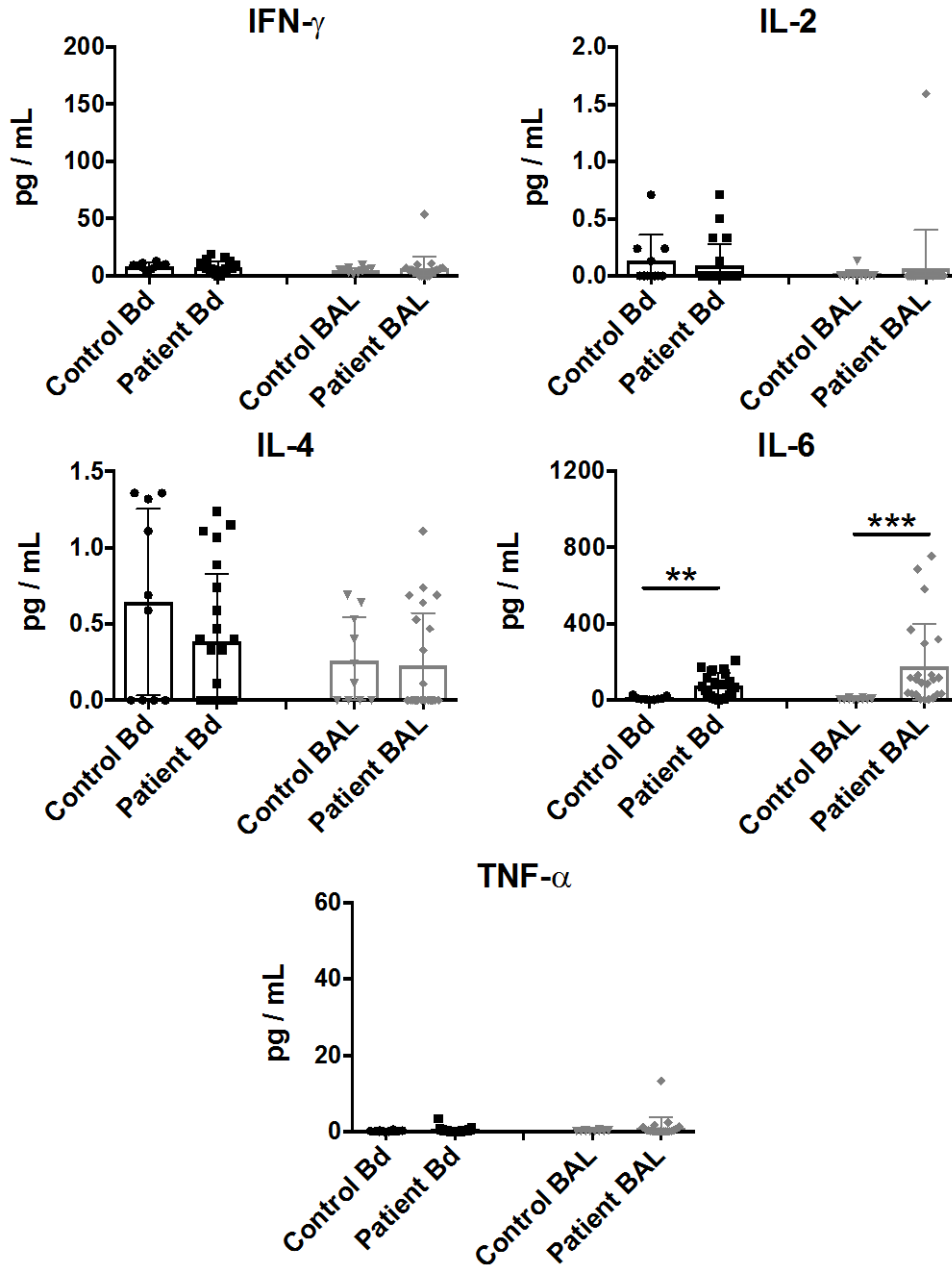


Figure 1. Cytokine profiling of plasma (represented by Bd) and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from sepsis patient samples. Cytokine assessment was performed on plasma or BAL fluid samples which were collected within 48 h of clinical classification of severe sepsis and ICU admission. IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, and TNF- α levels are represented as pg/mL in mean \pm SEM, with all data from individual controls or patients. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, where ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$ were considered for statistical significance.

1.3. Natural Killer (NK) Cell Subsets Are Reduced in Peripheral Blood but Unchanged in BAL Fluid Samples after Sepsis

We next assessed the lymphocytic composition of these samples. The numbers of CD3^{neg} and

CD56^{bright} or CD56^{dim} NK cell subsets in the peripheral blood and BAL fluid samples from sepsis patients and healthy controls were determined and compared. Representative flow cytometry results from each group are shown in Supplementary Figure S1, and the median and scattering plot comparisons of each group are shown in Figure 2A (for CD56^{bright} subset) and 2B (for CD56^{dim} subset). In agreement with previous studies [19,25,26], both NK cell subsets were clearly reduced in number in the peripheral blood compartment of sepsis patients, in comparison to healthy controls. In contrast, no differences were observed in these cell levels in the BAL fluid samples.

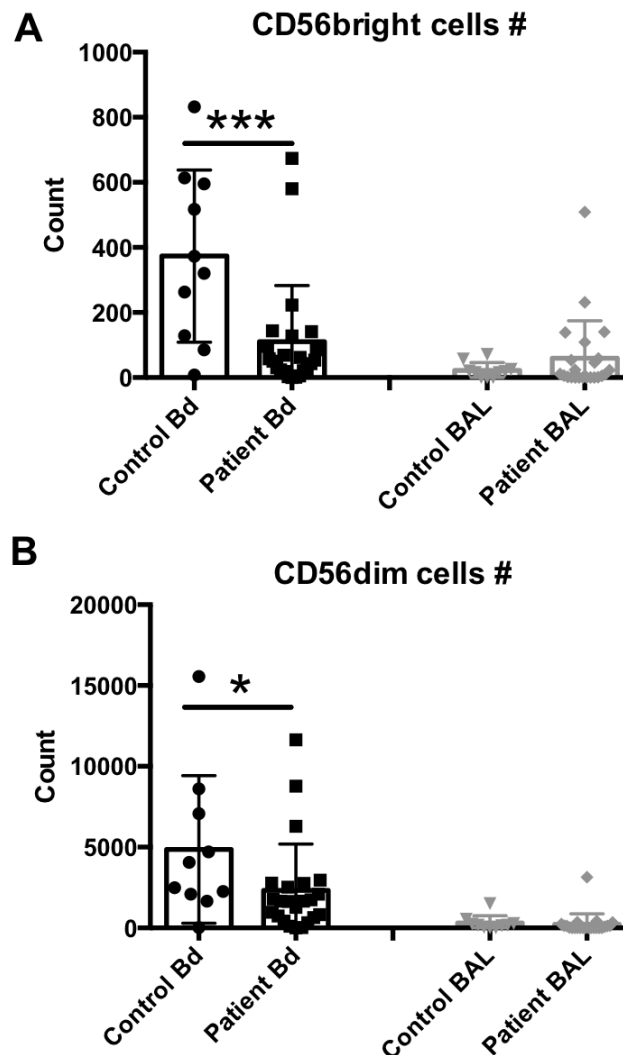


Figure 2. NK cell subset assessment in the peripheral blood or BAL fluid of sepsis patients. (A) Peripheral blood (number per 50 μ L blood) and BAL fluid (number recovered from the total BAL lavage) CD56^{bright}, CD3^{neg}, 7AAD^{neg} cells were quantified by flow cytometry. (B) Peripheral blood (number per 50 μ L blood) and BAL fluid (number recovered from the total BAL lavage) CD56^{dim}, CD3^{neg}, 7AAD^{neg} cells were quantified by flow cytometry. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test, where * $p < 0.05$, or *** $p < 0.001$ were considered for statistical significance.

1.4. T CD4 and T CD8 Cell Levels Are Also Reduced in the Peripheral Blood, but Not in the BAL Fluid of Sepsis Patients

To compare whether reduced NK cell levels in the peripheral blood and sustained NK cell levels in the BAL fluid are comparable with other lymphocytic subset levels, also described as lymphopenic in sepsis [25], we performed additional staining to determine T CD4 and T CD8 cell levels in the same samples. Representative flow cytometry results from each group are shown in Supplementary Figure

S2, and the median and scattering plot comparisons of each group are shown in Figure 3A (for T CD4 cell subset) and Figure 3B (for T CD8 cell subset). In agreement with the NK cell levels, other lymphocytes such as T cells also seem to suffer from the global lymphocytic lymphopenia previously observed in the peripheral blood of sepsis patients. However, the BAL fluid levels also remained unchanged for these cell subsets, suggesting that the lung microenvironment does not mimic the lymphopenia observed in the peripheral circulation or recruit lymphocytes in response to infection.

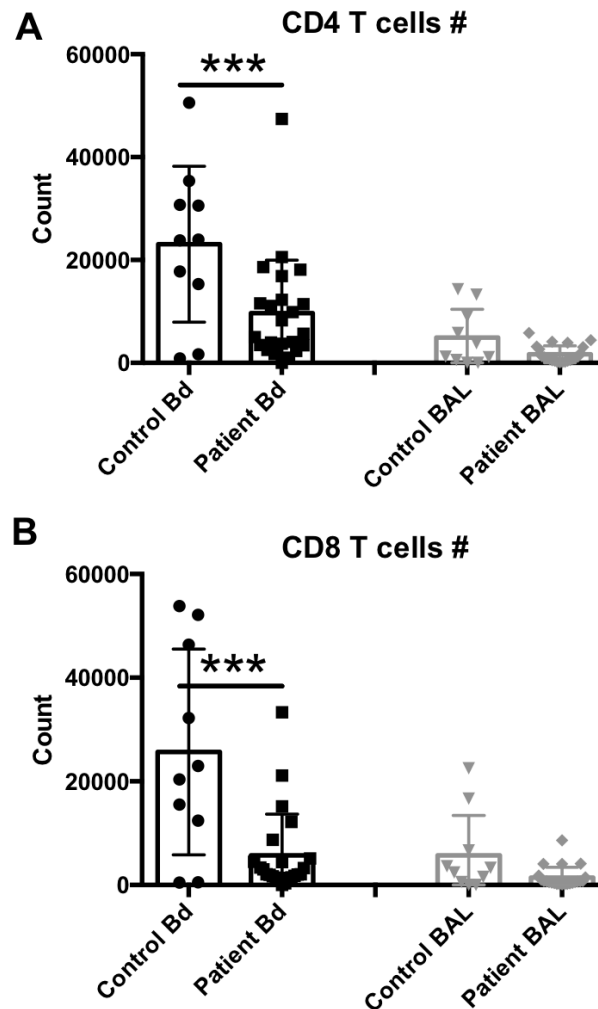


Figure 3. T cell subset assessment in the peripheral blood or BAL fluid of sepsis patients. **(A)** Peripheral blood (number per 50 μ L blood) and BAL fluid (number recovered from the total BAL lavage) CD4⁺, CD3⁺, CD8^{neg}, 7AAD^{neg} cells were quantified by flow cytometry. **(B)** Peripheral blood (number per 50 μ L blood) and BAL fluid (number recovered from the total BAL lavage) CD4^{neg}, CD3⁺, CD8⁺, 7AAD^{neg} cells were quantified by flow cytometry. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test, where *** $p < 0.001$ was considered for statistical significance.

2. Discussion

Our current study aimed to further characterize the immune status of NK cells in both the peripheral blood and the BAL fluid of patients with bacterial pneumonia. Consistent with previous reports from our group and others [25,26], we observed both NK and T cell lymphopenia in the peripheral blood of sepsis patients. The site of infection as well as both systemic and local variables were historically considered in scores that predict patient survival [27]. Sample acquisition of peripheral blood for studying immune cells in sepsis patients is commonly performed due to the convenience of acquiring these types of samples. However, due to the nature of the bacterial insult, the type of

leukocytes found at the site of infection may be significantly different from the peripheral blood cells due to the complex and compartmentalized inflammatory response in sepsis [28]. In addition, a recent study demonstrated that the local microenvironment controls the compartmentalization of NK cell responses during experimental systemic inflammation [9]. To date, our study was the first to compare these cell populations simultaneously in both peripheral blood and BAL fluid samples from sepsis patients, and to measure these cell levels systemically and at respective infection sites. Interestingly, both NK cells and other lymphocytes such as T CD4 and T CD8 cells displayed blood lymphopenia, while no altered levels of these cell subsets were observed in the BAL fluid samples.

Lymphopenia during sepsis is a clinically described phenomenon which is hypothesized to result either because of trafficking to the infection sites, or cell death. Hotchkiss and colleagues previously demonstrated that lymphopenia is a consequence of lymphocyte apoptosis during sepsis, and that prevention of lymphocyte death improves survival in mice [29]. The same group also reported that administration of interleukin-(IL)-7 and IL-15 reversed lymphocyte apoptosis and improved sepsis survival in experimental mice models [30,31]. The same group also showed that in patients, persistent lymphopenia is a predictor of mortality and sepsis-induced immunosuppression [32]. Based on these findings, new clinical trials studying the administration of recombinant IL-7 are currently being evaluated in an attempt to reverse lymphopenia and sepsis-induced immunosuppression in sepsis patients (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02640807 and NCT02797431). In contrast to the cell death-induced lymphopenia hypothesis, Herzig and colleagues demonstrated that in experimental peritoneal sepsis, murine NK cells migrate into the peritoneal cavity via a chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3)-induced mechanism, resulting in peripheral blood lymphopenia. This suggests that it may be a consequence of chemotaxis to the infection site [33], as well as the inflammation/cytokine-induced activation state of both lymphocytes and endothelial cells [34]. One possible hypothesis, which may explain peripheral blood lymphopenia but unchanged cell levels in other compartments, is that cellular activation may result in increased cell adhesion molecules which anchor specific lymphocytes to the endothelial wall. This possibility could result in less soluble lymphocytes in blood, which would resemble a peripheral blood lymphopenia scenario.

Although experimental sepsis is a powerful tool used to understand the mechanisms of immune responses in the process of this syndrome, the immune response variability to pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) between different species can vary by over 10,000-fold between mice and humans [35]. In addition, a subsequent systematic study which evaluated how well murine models mimic human sepsis revealed poor translation of genomic responses between species [36]. Our study supports the hypothesis that lymphopenia in sepsis is likely to be associated with apoptosis-induced cell death during the exaggerated inflammatory event [37]. However, our study was limited to BAL fluid sampling, and there is a possibility that using samples from homogenates of lung biopsies could reveal a different outcome. In this study, we further extended the concept of NK cell levels in different compartments in sepsis patients, and demonstrated that blood lymphopenia is not necessarily associated with increased levels of these cells in the BAL fluid of lung-related sepsis patients.

3. Experimental Section

3.1. Clinical Samples

Intensive care unit (ICU) patients with a confirmed diagnosis of pneumonic sepsis, and healthy controls undergoing post surgery-related tracheostomy monitoring, were recruited into an established, ethically-approved study investigating the natural history and pathogenesis of sepsis in the Hospital Cajuru, Curitiba/PR, Brazil. The study was approved by the regional ethics committee of the Hospital Cajuru and Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba/PR, Brazil (CAAE: 16930013.0.0000.0102, Number: 439.881, Date of approval: 9 October 2013), and Federal University of Parana, Curitiba/PR, Brazil (Number: 398.997, Date of approval: 11 September 2013). In addition, a written informed consent to participate in the study was obtained for each patient, or if not possible, from the patient's next-of kin. Peripheral blood and BAL fluid samples were acquired from 23 patients

within 48 h post ICU admission. Patients were recruited according to sepsis classification, where any subject with cancer, HIV, undergoing tissue transplantation or chronic corticosteroid or other immunosuppressive medication therapy were excluded. Healthy controls undergoing prolonged orotracheal intubation were monitored by routine bronchoscopy to survey lung status. BAL fluid was collected, as previously described [38,39], from segmental bronchus from medium lobe, excluding any subject with active lung disease at the time of the exam. BAL fluid samples were promptly placed in silicone tubes connected to the aspiration system through the vacuum suction system. Blood samples were also acquired from the same patients and healthy controls' peripheral veins in heparin-containing collection tubes. All samples were immediately sent for analysis.

Individuals with confirmed bacterial infection were classified as patients with sepsis. Individuals in whom infection was not confirmed were classified as Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) patients and were not included in the analysis. Patient samples were compared to samples from 10 healthy volunteers and all samples were collected at the Hospital Cajury (Serviço de Endoscopia Respiratória e Cirurgia Torácica do Hospital Universitário Cajuru), Curitiba/PR, Brazil. All fresh samples were processed for flow cytometry, and cytokine analysis was performed from frozen BAL supernatant and plasma, maintained at -80°C until the day of analysis.

3.2. Reagents

Labeled antibodies against the following antigens were used: anti-CD3 (clone UCHT1), anti-CD56 (clone HCD56), anti-CD19 (clone HIB19), anti-CD20 (clone 2H7), anti-CD4 (clone RPA-T4), anti-CD8 (clone SK1). All antibodies, Fc block reagent (anti-CD16/32) and 7-AAD, used as viability dye, were purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA). Cytokines were measured by flow cytometry using the Human Th1/Th2 Cytometric Bead Array Kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA).

3.3. Flow Cytometry

Cell surface antigens were labeled by diluting antibodies in staining buffer at the concentration suggested by the manufacturers. All samples were processed as previously described by our group [26]. All flow cytometry data was acquired via a FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and analyzed using the Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Cell numbers were determined as previously described [26], by gating the respective lymphocyte subsets using the FACS Calibur cytometer, allowing for absolute counting. All cytokines from sepsis patients and healthy control samples were detected using Cytometric Bead Array (CBA) technology according to the manufacturer's instructions using a FACS Verse cytometer to acquire samples, and FCAP Array software to analyze them (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was achieved using Graph Pad Prism Software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data was considered to be statistically significant where the p -value was equal to or less than 0.05. Statistical tests used were the Mann Whitney test, or one-way ANOVA with Tukey's post hoc test for group comparison.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at www.mdpi.com/1422-0067/18/3/616/s1.

Acknowledgments: We thank Marlos de Souza Coelho, Yelena Krasnova, and Jean-Marc Cavaillon for discussion, comments and advice on this project. Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes was supported by a NHMRC Early Career Fellowship, a National Breast Cancer Foundation (NBCF) Fellowship, and a Cancer Cure Australia Priority-Driven Young Investigator Project Grant.

Author Contributions: Paulo Souza-Fonseca-Guimaraes, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes and Anita Nishiyama designed the research, and supervised the work; Paulo Souza-Fonseca-Guimaraes, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes and Anita Nishiyama wrote the paper; Paulo Souza-Fonseca-Guimaraes, Lidiane Maria Boldrini Leite, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes, Fernando Guimaraes, Caroline Natânia De Souza-Araujo, Anita Nishiyama, Alexandra Cristina Senegaglia performed the research; Paulo Souza-Fonseca-Guimaraes, Fernando Souza-Fonseca-Guimaraes, Fernando Guimaraes, Caroline Natânia De Souza-Araujo, and Anita Nishiyama analyzed the data.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Seymour, C.W.; Liu, V.X.; Iwashyna, T.J.; Brunkhorst, F.M.; Rea, T.D.; Scherag, A.; Rubenfeld, G.; Kahn, J.M.; Shankar-Hari, M.; Singer, M.; et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 762–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Shankar-Hari, M.; Phillips, G.S.; Levy, M.L.; Seymour, C.W.; Liu, V.X.; Deutschman, C.S.; Angus, D.C.; Rubenfeld, G.D.; Singer, M.; Sepsis Definitions Task, F. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315*, 775–787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Angus, D.C.; Linde-Zwirble, W.T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the united states: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* **2001**, *29*, 1303–1310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Schulte, W.; Bernhagen, J.; Bucala, R. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets—An updated view. *Mediat. Inflamm.* **2013**, *2013*, 165974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bone, R.C.; Sibbald, W.J.; Sprung, C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* **1992**, *101*, 1481–1483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Annane, D.; Bellissant, E.; Cavaillon, J.M. Septic shock. *Lancet* **2005**, *365*, 63–78. [[CrossRef](#)]
7. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **2002**, *420*, 885–891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: Natural killer cells in sepsis—Guilty or not guilty? *Crit. Care* **2013**, *17*, 235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rasid, O.; Cavaillon, J.M. Recent developments in severe sepsis research: From bench to bedside and back. *Future Microbiol.* **2016**, *11*, 293–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Bone, R.C. Sir isaac newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* **1996**, *24*, 1125–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Parlato, M.; Cavaillon, J.M. Host response biomarkers in the diagnosis of sepsis: A general overview. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1237*, 149–211. [[PubMed](#)]
12. Adib-Conquy, M.; Cavaillon, J.M. Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thromb. Haemost.* **2009**, *101*, 36–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit. Care Med.* **2005**, *33*, S506–S509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Adib-Conquy, M.; Scott-Algara, D.; Cavaillon, J.M.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol. Cell Biol.* **2014**, *92*, 256–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Krasnova, Y.; Putz, E.M.; Smyth, M.J.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F. Bench to bedside: NK cells and control of metastasis. *Clin. Immunol.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Souza-Fonseca-Guimaraes, F. NK cell-based immunotherapies: Awakening the innate anti-cancer response. *Discov. Med.* **2016**, *21*, 197–203. [[PubMed](#)]
17. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Adib-Conquy, M.; Cavaillon, J.M. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: Angels or devils? *Mol. Med.* **2012**, *18*, 270–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Parlato, M.; Fitting, C.; Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M. NK cell tolerance to TLR agonists mediated by regulatory T cells after polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 5850–5858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Andaluz-Ojeda, D.; Iglesias, V.; Bobillo, F.; Almansa, R.; Rico, L.; Gandia, F.; Loma, A.M.; Nieto, C.; Diego, R.; Ramos, E.; et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care* **2011**, *15*, R243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sathe, P.; Delconte, R.B.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Seillet, C.; Chopin, M.; Vandenberg, C.J.; Rankin, L.C.; Mielke, L.A.; Vikstrom, I.; Kolesnik, T.B.; et al. Innate immunodeficiency following genetic ablation of MCL1 in natural killer cells. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Etogo, A.O.; Nunez, J.; Lin, C.Y.; Toliver-Kinsky, T.E.; Sherwood, E.R. NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 6334–6345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Young, A.; Mittal, D.; Martinet, L.; Bruedigam, C.; Takeda, K.; Andoniu, C.E.;

- Degli-Esposti, M.A.; Hill, G.R.; Smyth, M.J. NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E2376–E2384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. De Jong, H.K.; van der Poll, T.; Wiersinga, W.J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J. Innate Immun.* **2010**, *2*, 422–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 24. Mera, S.; Tatulescu, D.; Cismaru, C.; Bondor, C.; Slavcovici, A.; Zanc, V.; Carstina, D.; Oltean, M. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS* **2011**, *119*, 155–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 25. Venet, F.; Davin, F.; Guignant, C.; Larue, A.; Cazalis, M.A.; Darbon, R.; Allombert, C.; Mouglin, B.; Malcus, C.; Poitevin-Later, F.; et al. Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. *Shock* **2010**, *34*, 358–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 26. Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Parlato, M.; Philippart, F.; Misset, B.; Cavaillon, J.M.; Adib-Conquy, M.; Captain Study Group. Toll-like receptors expression and interferon-gamma production by NK cells in human sepsis. *Crit. Care* **2012**, *16*, R206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 27. Ponting, G.A.; Sim, A.J.; Dudley, H.A. Comparison of the local and systemic effects of sepsis in predicting survival. *Br. J. Surg.* **1987**, *74*, 750–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 28. Cavaillon, J.M.; Annane, D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J. Endotoxin Res.* **2006**, *12*, 151–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 29. Hotchkiss, R.S.; Tinsley, K.W.; Swanson, P.E.; Chang, K.C.; Cobb, J.P.; Buchman, T.G.; Korsmeyer, S.J.; Karl, I.E. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14541–14546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 30. Inoue, S.; Unsinger, J.; Davis, C.G.; Muenzer, J.T.; Ferguson, T.A.; Chang, K.; Osborne, D.F.; Clark, A.T.; Coopersmith, C.M.; McDunn, J.E.; et al. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 1401–1409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 31. Unsinger, J.; McGlynn, M.; Kasten, K.R.; Hoekzema, A.S.; Watanabe, E.; Muenzer, J.T.; McDonough, J.S.; Tschoep, J.; Ferguson, T.A.; McDunn, J.E.; et al. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 3768–3779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 32. Drewry, A.M.; Samra, N.; Skrupky, L.P.; Fuller, B.M.; Compton, S.M.; Hotchkiss, R.S. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock* **2014**, *42*, 383–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 33. Herzig, D.S.; Driver, B.R.; Fang, G.; Toliver-Kinsky, T.E.; Shute, E.N.; Sherwood, E.R. Regulation of lymphocyte trafficking by CXC chemokine receptor 3 during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *185*, 291–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 34. Oppenheimer-Marks, N.; Davis, L.S.; Lipsky, P.E. Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration. Alteration of receptor use relates to the activation status of both the T cell and the endothelial cell. *J. Immunol.* **1990**, *145*, 140–148. [[PubMed](#)]
 35. Warren, H.S.; Fitting, C.; Hoff, E.; Adib-Conquy, M.; Beasley-Topliffe, L.; Tesini, B.; Liang, X.; Valentine, C.; Hellman, J.; Hayden, D.; et al. Resilience to bacterial infection: Difference between species could be due to proteins in serum. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201*, 223–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 36. Seok, J.; Warren, H.S.; Cuenca, A.G.; Mindrinos, M.N.; Baker, H.V.; Xu, W.; Richards, D.R.; McDonald-Smith, G.P.; Gao, H.; Hennessy, L.; et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 3507–3512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 37. Girardot, T.; Rimmele, T.; Venet, F.; Monneret, G. Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries. *Apoptosis* **2016**, *22*, 295–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 38. Goldstein, R.A.; Rohatgi, P.K.; Bergofsky, E.H.; Block, E.R.; Daniele, R.P.; Dantzker, D.R.; Davis, G.S.; Hunninghake, G.W.; King, T.E., Jr.; Metzger, W.J.; et al. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1990**, *142*, 481–486. [[PubMed](#)]
 39. Meyer, K.C.; Raghu, G.; Baughman, R.P.; Brown, K.K.; Costabel, U.; du Bois, R.M.; Drent, M.; Haslam, P.L.; Kim, D.S.; Nagai, S.; et al. An official American thoracic society clinical practice guideline: The clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *185*, 1004–1014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



ANEXO 7 – ARTIGO A SER SUBMETIDO

Applications of Vitamin D in Sepsis Prevention

Paulo Souza-Fonseca-Guimaraes*

* Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná CEP 81531-990, Brazil;
paulosfguimaraes@gmail.com (P.S.F.G);

Sepsis is a devastating systemic inflammatory disease whose pathophysiology involves several enigmas that have yet to be unraveled. Although the most understood effect of vitamin D (VD) is related in the maintenance of calcium and phosphorus homeostasis in bone mineralization, VD has also been shown to modulate adaptive and innate immunity, decreasing susceptibility to infection and influencing the development of, and recovery from, sepsis. Evidence suggests that VD prevents excessive production of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, TNF α and INF γ ; increases anti-inflammatory cytokines such as IL-4 and IL-10; increases the antibacterial capacity of macrophages, which produce antimicrobial peptides known as defensins and cathelicidins, by activating toll-like receptors; and increase the oxidative potential of monocytes. On the other hand, as patients with sepsis have VD metabolism disorder and are frequently deficient or display insufficient plasma VD levels which may contribute to worsening prognosis of patients with sepsis, suggesting that their supplementation may be beneficial. Here we provide a historical background on VD status and potential perspectives for usage as supplementation to prevent sepsis and/or enhance patient recovery, despite the traditional recommendations of ingestion that are indicated to avoid diseases related to bone health but appear to be insufficient for the improvement of the immune response in susceptible patients.

Keywords: sepsis, vitamin D, antimicrobial peptides, defensins, cathelicidins.

Introduction

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by dysregulated host responses to infection [1,2,3]. Sepsis is the main cause of hospitalization in non-coronary intensive care units, representing the tenth cause of death in developed countries with more than 210,000 annual deaths in the USA [4]. Sepsis is defined as the development of two or more symptoms of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) including abnormal thermal regulation, atypical leukocyte count,

tachycardia and tachypnea [5,6]. Left untreated, sepsis may progress to severe sepsis with the development of further complications such as multiple organ failure (MOF) [6]. These patients have an increased risk of subsequently advancing into septic shock—a state of persistent hypotension despite intravenous fluid resuscitation due to acute circulatory failure. Both MOF and septic shock lead to eventual death [5,6].

The pathophysiology of sepsis with emphasis on its cellular and molecular mediators of the inflammatory response still needs to be elucidated. It is essential to develop a targeted and efficient treatment strategy against sepsis because there is currently an increased incidence of sepsis, with a consequent increase in the incidence of microorganism resistance to antibiotics and worsening of the effectiveness of antibiotic treatment against sepsis [7,8]. The innate immune system is a key player in the early stages of sepsis and various studies have focused on the role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of sepsis [9]. There is increasing evidence translational that vitamin D (VD) is a key regulator of immune function that modulates the innate and adaptive immune responses, decreasing susceptibility to infection and influencing the development of and recovery from sepsis [7,8,10,11]. Collectively these data provide evidence that sepsis patients could benefit from VD supplementation. In this review, we will discuss the biological relevance of VD in sepsis, and potential emerging vitamin-related therapies.

Vitamin D metabolism

The primary and best-known role of VD is in the maintenance of calcium and phosphorus homeostasis in bone mineralization. Deficiency of these minerals can lead to rickets, osteomalacia and osteoporosis [12,13,14]. As it is liposoluble, VD can enter the cells and act as a steroidal hormone whose pleiotropic effects protect the organism against various diseases, including infections, heart diseases, hypertension,

autoimmune diseases and diabetes [15,16,17]. It can be obtained in the diet as ergocalciferol (D2) in plant form or cholecalciferol (D3) in animal form. However, up to 90% is made endogenously in the epidermis after exposure to UVB rays in sunlight. To ensure adequate levels of VD, at least three hours of direct sunlight are required every day [7,12,14]. In the plasma, VD binds to vitamin D-binding protein (VDBP), which distributes it throughout the body, and undergoes hydroxylation by cytochrome P450 CYP27A1 (25-hydroxylase) to form 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D, or calcidiol], its storage form, which is then converted, in an autocrine manner or in response to cytokines, to the active form 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D, or calcitriol], by CYP27B1 (1 α -hydroxylase), an enzyme found in over thirty types of cells. This conversion can take place peripherally, but most 1,25(OH)₂D is produced in the kidney, mainly in response to calcium and parathyroid hormone [7,9,12,14,18,19]. **Figure 1**, illustrate the metabolic availability of VD, and its effects in homeostasis.

VD prevents excessive expression of proinflammatory cytokines, has been associated with improved coagulation in sepsis, activates endothelial cells and increases the antibacterial capacity of macrophages, influencing activation of toll-like receptors (TLRs), leukocyte migration, local inflammation and innate immune responses against bacteria [16,20,21,22]. The enzyme CYP27B1 is expressed in most cells in the immune system, which also express vitamin D receptor (VDR), a nuclear receptor that modulates expression of the genes involved in cytokine production and acts on antigen-presenting cells (APCs), such as monocytes, macrophages and dendritic cells, and T lymphocytes [23,24,25]. VD tends to favor a mononuclear cell phenotype with increased VDR expression in monocytes and macrophages in response to infection. After it binds to VDR it is converted into its active form, which plays a role in B-cell homeostasis and facilitates neutrophil motility and function. The

active form also increases macrophage oxidative burst potential and induces macrophages to mature and produce acid phosphatase and hydrogen peroxide, which are responsible for the antimicrobial function of these cells [10,26].

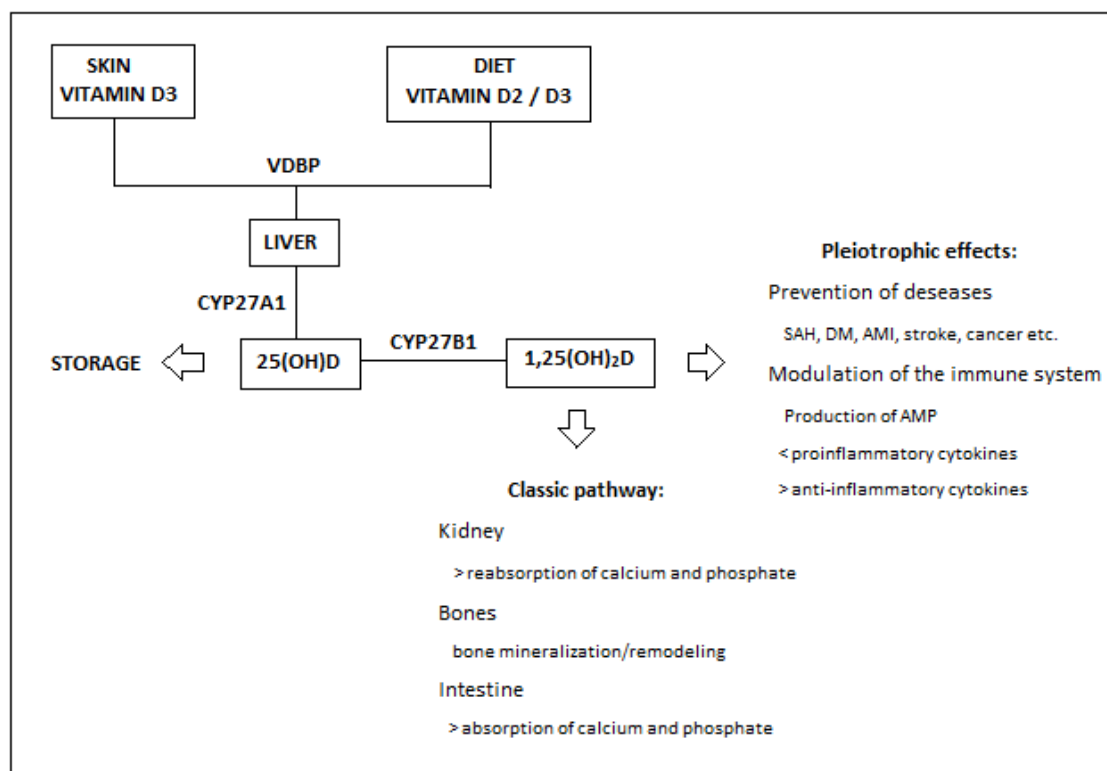


Figure 1. VD can be made the endogenously in the epidermis after exposure to UVB rays in sunlight producing Vitamin D3 or obtained in the diet as Vitamin D2 or D3. In the plasma, VD binds to VDBP, which distributes it throughout the body, and undergoes hepatic hydroxylation by CYP27A1 to form 25(OH)D, its storage form, which is then converted to the active form 1,25(OH)₂D by CYP27B1. Most 1,25(OH)₂D is produced in the kidney, mainly in response to calcium and parathyroid hormone as part of the classic pathway. On the other hand, VD can enter the cells and act as a steroidal hormone whose pleiotropic effects protecting the organism against various diseases and modulating of the immune system.

Vitamin D deficiency and its consequences

Most VD metabolites have a very short plasma half-life; however, 25(OH)D, the most abundant and stable, has a half-life of around three weeks and is the most important indicator of vitamin D nutritional status [7,12,14]. Measurement of VD is

recommended for certain conditions, including osteoporosis, chronic kidney disease, liver diseases, malabsorptive diseases such as cystic fibrosis and inflammatory bowel disease, hyperparathyroidism, granulomatous diseases such as sarcoidosis, tuberculosis and histoplasmosis; following bariatric surgery and radiotherapy; and lymphomas. A serum VD level of ≤ 20 ng/mL is interpreted as deficiency, 21 to 29 ng/mL as insufficiency and ≥ 30 ng/mL as sufficiency. A serum level between 30 and 100 ng/mL is considered normal [12,14,15,21,27,28]. Approximately 1 billion people around the world have VD insufficiency or deficiency. The latter is associated with the leading causes of death by disease and is found in all critically ill patients with sepsis and 92% of those without sepsis [29]. What level constitutes VD sufficiency is controversial in critically ill patients and its measurement should be interpreted with caution in this patients whose concentrations of albumin and BVDV can fluctuate, besides the dilutional effect of intravenous volume resuscitation and loss of transport proteins [29,30]. Nevertheless, not only are there few studies on the effects of VD supplementation, which can improve immunological function and has been associated with reduced risk of infections, but there is also no consensus on the plasma concentration needed to ensure the extraskelatal pleiotropic effects of VD, although it has been suggested that higher serum concentrations of around 40 to 50 ng/mL are required [8,13,14,31,32,33,34]. Ergocalciferol (D2) can be used as a replacement or supplement, but cholecalciferol (D3) is more effective in maintaining and boosting 25(OH)D levels. The recommended daily intake of VD is 600 IU for individuals under 70 years of age and 800 IU for older individuals. These values should be at least 50% greater for susceptible individuals and 150% greater for pregnant and breastfeeding women [9,12].

Blacks or African Americans are more likely to develop sepsis and organic dysfunctions associated with VD deficiency. This is related to their greater skin pigmentation, which reduces VD production in the skin as melanin competes with the VD precursor 7-dehydrocholesterol to absorb UVB photons [7,10,13,27,35]. Obese individuals have more clinical complications and a greater prevalence of severe sepsis. Interestingly, these individuals have reduced plasma VD levels and produce 57% less VD in the skin than the normal-weight population. They also have lower rates of intestinal absorption of this vitamin [27,35]. The elderly have reduced serum VD levels and synthesize less than half as much VD as twenty year olds, which may be related to reduced photoproduction of VD in the skin by UVB as well as to the fact that the elderly, like the obese, do less physical activity and spend less time outside [27,35]. Other risk factors for VD deficiency include intestinal absorption problems in inflammatory bowel diseases and treatment with medication containing anticonvulsants, glucocorticoids, antifungal agents and antiretroviral agents. Young children, pregnant women and breastfeeding mothers are also more at risk [12,14,35]. VD deficiency prior to hospitalization is associated with greater mortality and a greater prevalence of positive blood-cultures in critical patients even after allowance has been made for any important comorbidities [36,37]. Markers of illness severity as the Acute Physiology Age Chronic Health Evaluation (APACHE) II, Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) and Simplified Acute Physiology Score 3 (SAPS 3) are frequently used to measure severity of medical illness and infection [37]. It is an important, independent predictor of sepsis and although there is no statistically significant correlation between VD levels and this scores on severity classification systems, the risk of mortality is 1.9 times greater in individuals with a VD deficiency [14,21,22,25,33,38]. In patients with a severe condition (APACHE II > 18), VD

deficiency may have a cumulative effect on results, with longer hospitalization, increased hospital costs, worse prognosis, predisposition to *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* infections and increased mortality [11,13,15,22]. The causal association has yet to be elucidated, but there is known to be an increase in proinflammatory interleukins, with adverse effects such as excess oxidative stress and increased expression of endothelial adhesion molecules, which play an important role in the pathogenesis of sepsis [11,32,34]. The effects of 1,25(OH)₂D include inhibition of T cell proliferation, a reduction in proinflammatory cytokines (TNF α , INF γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 and IL-17) and an increase in anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) [14,23,39,40].

As patients who are hospitalized with a serious condition have lower levels of 25(OH)D than healthy individuals and even though septic patients do not show any significant deficiency compared with other patients in a severe condition, it has been suggested that suitable levels of VD can play an important protective role in these patients, particularly those with sepsis [14,22,28,41]. Low VD levels in sepsis can be a result of protein catabolism with consequent reduced levels of VDBP, a key protein and predictor of mortality in intensive care units which is associated with early sepsis and a worse prognosis when present in reduced absolute levels [14,28]. However, as the immune assay used to detect 25(OH)D depends on VDBP, and levels of this protein are reduced in sepsis, hypoalbuminemia and hemodilution (serum concentrations of VDBP can be reduced by 35% during the first 24 hours of intravenous fluid replacement), it remains unclear whether there is a correlation between sepsis and reduced 25(OH)D levels [10,13,21,28]. Furthermore, critically ill patients are less exposed to sunlight and do not receive sufficient VD in their diet for beneficial effects on the immune system [15]. Another factor that can influence VD deficiency is

seasonality, as plasma 25(OH)D levels vary during the year, reaching a maximum in the autumn and a minimum after the winter. This may explain the finding that mortality rates due to sepsis are lower in the summer [10,13,16,41].

The effects of vitamin D on the immune system and its links with sepsis

The innate immune system acts to identify invading organisms quickly and responds with humoral and cellular defense mechanisms to contain, neutralize and remove pathogens. These are identified by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that bind to pattern recognition receptors (PRRs) in neutrophils and monocytes and also in certain epithelial cells that have antipathogenic activity [13,19,35]. VD plays a role in various steps of the immune response, and a deficiency of this vitamin is associated with defects in macrophage functions, such as chemotaxis, phagocytosis and cytokine production [10,13,18]. Monocytes act in antigen presentation and phagocytosis and recognize PAMPs through transmembrane molecules known as toll-like receptors (TLRs). One of these, TLR4, recognizes and binds to lipopolysaccharide (LPS), a substance produced by gram-negative bacteria that stimulates the inflammatory cascade and plays an important role in the pathogenesis of sepsis. LPS activates endothelial cells to produce NF- κ B, a transcription factor, and proinflammatory chemokines and cytokines such as IL-6 and IL-8 [42]. This process can be modulated by VD, which inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells and protects normal endothelial function, decreasing mortality risk in septic patients [10,13,14,21,22,40]. Therefore, the effect of vitamin D on its endothelial receptors resembles that of inotropic drugs, which may be beneficial in preventing septic shock [20].

TLRs play a key role in innate immunity and can recognize PAMPs, LPS and flagella, allowing an immune response to invading bacteria regardless of previous

exposure to them, antigen processing, phagocytosis or production of TNF α [7,27]. Binding of bacterial ligands to monocyte PRRs induces expression of VD receptor (VDR) and 1 α -hydroxylase genes in an autocrine manner, generating VD response elements (VDREs). These in turn induce genes for the production of antimicrobial peptides (AMPs) with broad antibacterial, antiviral and antifungal effects that act as the body's first line of defense, promote wound repair and induce the release of nitric oxide (NO), which causes oxidative stress and bacterial cell death [9,19,24,27,33]. In monocytes and macrophages, TLR1 and TLR2 recognize invading bacteria and form a heterodimer with components of the invading microorganism that stimulates phagocytosis and induces expression of VDR and CYP27B1 genes [29]. This promotes autocrine/paracrine actions of 1,25(OH) $_2$ D that increase the oxidative potential of monocytes, recruit other cells from the immune system to fight the infection and induce formation of AMPs [7,41]. Because of this, some researchers suggest that the immunomodulatory effects of circulating 1,25(OH) $_2$ D are less important than those of locally produced 1,25(OH) $_2$ D [39].

Humans have two types of AMPs: defensins and cathelicidins. Their bactericidal effect is believed to be due to the formation of transmembrane pores in the bacterial membrane, which results in increased permeability and bacterial death inside the phagosome [13,16,27]. Hepcidin, another AMP, is involved in modulation of tissue distribution of iron and is also regulated by VD, which downregulates its expression, leading to reduced iron levels in the cellular environment and affecting bacteria that depend on iron to proliferate [35]. Human β -defensin-2 (HBD-2) can be particularly effective against multiresistant microbes, as observed in *in vitro* studies, and human β -defensin-3 (HBD-3) has more effective broad-spectrum antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria as well as fungi than HBD-2 [24]. The only

human cathelicidin is hCAP-18, which is stored in intracellular granules as a biologically inactive precursor to be cleaved by proteinase 3 and released in the plasma in its active form LL-37, which has potent activity against gram-positive and gram-negative bacteria and several types of virus and fungi, as well as mycobacteria [29,43]. LL-37 is the human innate immune system's first line of defense against infections, and optimal production of this peptide depends on a suitable concentration of VD [7,27,39]. Patients with VD deficiency can have reduced leukocyte hCAP18 mRNA expression and, consequently, reduced production of cathelicidin, which may be associated with increased susceptibility to nosocomial infections, such as pneumonia, sepsis and central venous catheter-related infections [24,41,44,45]. Release of LL-37 is stimulated by cytokines such as IL-6, IL-10 and IL-18 and leads to activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 (STAT 1 and 3), inducing chemotaxis of neutrophils, monocytes, macrophages and T cells in the skin and promoting proliferation and migration of keratinocytes[9,14]. LL-37 is produced by phagocytic leukocytes, mucous epithelium and keratinocytes and is found in mucosal secretions and plasma. It has *in vitro* antimicrobial activity against important human pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci [43]. LL-37 acts by disrupting foreign cell membranes, binding to LPS residues and inducing leukocyte recruitment. It is found mainly in neutrophil granules but is also produced and secreted by monocytes, macrophages and other types of cells [43,45]. In animal models, cathelicidin deficiency is associated with increased susceptibility to bacterial infection. It has also been shown to disrupt biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and to promote phagocytosis, increased production of reactive oxygen species (ROS) and chemotaxis of other

immune system cells to infection sites [10,13,34]. AMPs can also be released in the respiratory epithelium, skin and placenta by activation of TLR2 and TLR4 in macrophages and monocytes, highlighting the role played by VD in the immune function of epithelial barriers [7]. In the future, therefore, cathelicidin and its analogs may be alternative therapeutic options for suppressing proinflammatory responses in sepsis. However, the suitability of these molecules for clinical use is limited by their potential cytotoxicity as they induce mast-cell degranulation, which releases histamine and can result in anaphylactoid reactions. A further limitation is their high cost [14].

The effects of VD can also be observed in the adaptive immune system, although in this case inhibiting it with reduction of the inflammatory response [30]. More than 100 genes have been identified as targets of $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, with effects on dendritic cells, which present antigens to T cells, and on helper T cells (Th cells), inhibiting proliferation of Th1/Th17 cells, with a consequent reduction in production of proinflammatory cytokines such as IL-2, $\text{TNF}\alpha$ and $\text{INF}\gamma$, thus diverting cytokine production to the Th2 phenotype (IL-4, IL-5 and IL-10) [9,13,17,19,23,24,27,35]. It has been shown that $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ plays a role in B-cell homeostasis by inhibiting proliferation of these immune cells and their differentiation into plasma and memory cells as well as by inducing apoptosis of activated B cells [23,32].

Perspectives for VD supplementation in sepsis

Critically ill septic patients suffer from VD-metabolism and parathyroid disorders, and in one study a VD deficiency was observed in 96.15% of cases [22,46]. Plasma VD levels are lowest during infection peaks, leading to reduced antimicrobial capacity and ability to fight infection because of decreased production of AMPs [4]. Although reduced plasma VD levels are associated with increased susceptibility to infection and development of hospital-acquired blood infection, few studies have investigated

potentially modifiable host factors that could reduce these risks [8,46,47]. It has been reported that, after pretreatment with VD, endothelial cells can reduce production of proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-8) induced by LPS and inhibit activation of the NF- κ B pathway [36,37,42,48]. Use of VD could therefore improve therapeutic response and reduce the need to prescribe antibiotics, as there is evidence that maintenance of VD levels at around 45 ng/mL without affecting PTH levels, which should be less than 60 pg/mL to prevent compensatory hyperparathyroidism, may significantly reduce mortality and the incidence of infections in the upper respiratory tract [12,27,24,44]. Therefore, a high dose regimen may be necessary in critically ill patients, especially septic patients who usually have lower VD levels [13,14].

The multiple functions of VD in the immune system's response to infection suggest that supplementation with this vitamin could usefully be an integral element in the fight against sepsis [17]. In addition to being inexpensive and safe, supplementation provides benefits that can have a significant impact on public health and is recommended for both prevention of sepsis and treatment of septic patients, although a consensus has yet to be reached on the best plasma levels and the recommended daily intake [8,13,17,47]. In one study, hospital mortality was lower among patients who received VD supplementation (4%) than among those who did not (28%). Length of stay in intensive care was also shorter in the former group. Vitamin D2 or D3 supplementation can be used to achieve these benefits and should be administered during the first thirty days of hospitalization [48]. Parenteral supplementation should be considered in critically ill patients as it allows the immunomodulatory action of VD to be exerted more effectively given the reduced oral absorption of many nutrients and medications in these patients, which causes problems associated with absorption, hydroxylation and transport of VD and

conversion of 25(OH)D into 1,25(OH)₂D. VD supplementation is associated with lower levels of CRP, IL-6 and TNF α , indicating that it has positive immunomodulatory effects, such as dose-dependent reduction of proinflammatory cytokines, and immunosuppressive effects. Further interventional studies are required to determine the optimal doses of VD that should be administered [14,46,47] and to elucidate the effects of supplementation with this vitamin on immunity and sepsis [39].

Conclusion

The mechanism linking VD deficiency with increased mortality in septic patients may involve regulation of the adaptive and innate immune responses both expressing VDR. The role that VD can play in critically ill patients has yet to be defined, as there is no consensus to date on the relationship between its serum levels and its immunomodulatory actions in septic patients, on the risk factors associated with VD deficiency in sepsis and the correlation between serum levels of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D, on the real effects of comorbidities on serum VD concentration in critically ill patients, on the best supplementation dose and duration for critically ill patients and on the best markers for the immunological effects of VD in sepsis.

Conflict of interest: Author declares no conflict of interest.

References

1. Seymour, C.W.; Liu, V.X.; Iwashyna, T.J.; Brunkhorst, F.M.; Rea, T.D.; Scherag, A.; Rubenfeld, G.; Kahn, J.M.; Shankar-Hari, M.; Singer, M.; et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:762–774, 2016.
2. Shankar-Hari, M.; Phillips, G.S.; Levy, M.L.; Seymour, C.W.; Liu, V.X.; Deutschman, C.S.; Angus, D.C.; Rubenfeld, G.D.; Singer, M.; Sepsis Definitions Task, F. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for

- septic shock: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:775–787, 2016.
3. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 39(2):165-228, 2013.
 4. Angus, D.C.; Linde-Zwirble, W.T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the united states: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med* 29:1303–10, 2001.
 5. Bone, R.C.; Sibbald, W.J.; Sprung, C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101:1481–3, 1992.
 6. Annane, D.; Bellissant, E.; Cavaillon, J.M. Septic shock. *Lancet* 365:63–78, 2005.
 7. Shuler FD, Hendrix J, Hodroge S, Short A. Antibiotic-like actions of vitamin D. *W V Med J* 109(1):22-5, 2013.
 8. Quraishi SA, Litonjua AA, Moromizato T, Gibbons FK, Camargo CA Jr, Giovannucci E, Christopher KB. Association between prehospital vitamin D status and hospital-acquired bloodstream infections. *Am J Clin Nutr* 98(4):952-9, 2013.
 9. Kearns MD, Alvarez JA, Seidel N, Tangpricha V. Impact of vitamin D on infectious disease. *Am J Med Sci* 349(3):245-62, 2015.

10. Rech MA, Hunsaker T, Rodriguez J. Deficiency in 25-hydroxyvitamin d and 30-day mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Am J Crit Care* 23(5):71-9, 2014.
11. de Haan K, Groeneveld AB, de Geus HR, Egal M, Struijs A. Vitamin D deficiency as a risk factor for infection, sepsis and mortality in the critically ill: systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 18(6):660, 2014.
12. Calle Pascual AL, Torrejón MJ. Vitamin D and its "non-classical" effects. *Rev Esp Salud Publica* 86(5):453-9, 2012.
13. Kempker JA, Han JE, Tangpricha V, Ziegler TR, Martin GS. Vitamin D and sepsis: An emerging relationship. *Dermatoendocrinol* 4(2):101-8, 2012.
14. Izadpanah M, Khalili H. Potential benefits of vitamin D supplementation in critically ill patients. *Immunotherapy* 5(8):843-53, 2013.
15. Flynn L, Zimmerman LH, McNorton K, Dolman M, Tyburski J, Baylor A, Wilson R, Dolman H. Effects of vitamin D deficiency in critically ill surgical patients. *Am J Surg* 203(3):379-82, 2012.
16. Al Nozha OM. Vitamin D and extra-skeletal health: causality or consequence. *Int J Health Sci (Qassim)* 10(3):443-52, 2016.
17. Goldsmith JR. Vitamin D as an Immunomodulator: Risks with Deficiencies and Benefits of Supplementation. *Healthcare (Basel)* 3(2):219-32, 2015.
18. Solidoro P, Bellocchia M, Facchini F. The immunobiological and clinical role of vitamin D in obstructive lung diseases. *Minerva Med* 107(3):12-9, 2016.
19. Wei R, Christakos S. Mechanisms Underlying the Regulation of Innate and Adaptive Immunity by Vitamin D. *Nutrients* 7(10):8251-60, 2015.
20. Müller S, Laigaard F, Olgaard K, Hemmingsen C. Effect of 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in experimental sepsis. *Int J Med Sci* 4(4):190-5, 2007.

21. Moromizato T, Litonjua AA, Braun AB, Gibbons FK, Giovannucci E, Christopher KB. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and sepsis in the critically ill. *Crit Care Med* 42(1):97-107, 2014.
22. Su LX, Jiang ZX, Cao LC, Xiao K, Song JP, Li H, Zhang X, Yan P, Feng D, Liu CT, Li X, Xie LX. Significance of low serum vitamin D for infection risk, disease severity and mortality in critically ill patients. *Chin Med J (Engl)* 126(14):2125-30, 2013.
23. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients* 7(4):3011-21, 2015.
24. Youssef DA, Miller CW, El-Abbassi AM, Cutchins DC, Cutchins C, Grant WB, Peiris AN. A.; et. al. Antimicrobial implications of vitamin D. *Dermatoendocrinol* 3(4):220-9, 2011.
25. Murdoch DR, Slow S, Chambers ST, Jennings LC, Stewart AW, Priest PC, Florkowski CM, Livesey JH, Camargo CA, Scragg R. Effect of vitamin D3 supplementation on upper respiratory tract infections in healthy adults: the VIDARIS randomized controlled trial. *JAMA* 308(13):1333-9, 2012.
26. Gerke AK, Pezzulo AA, Tang F, Cavanaugh JE, Bair TB, Phillips E, Powers LS, Monick MM. Effects of vitamin D supplementation on alveolar macrophage gene expression: preliminary results of a randomized, controlled trial. *Multidiscip Respir Med* 26(9):4-7, 2014.
27. Watkins RR, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA. The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *J Infect* 63(5):321-6, 2011.

28. Watkins RR. Investigating the association between vitamin D deficiency and sepsis: challenges and future prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 10(7):723-5, 2012.
29. Kempker JA, Tangpricha V, Ziegler TR, Martin GS. Vitamin D in sepsis: from basic science to clinical impact. *Crit Care* 16(4):316, 2012.
30. Lee P. Vitamin D metabolism and deficiency in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(5):769-81, 2011.
31. Lange N, Litonjua AA, Gibbons FK, Giovannucci E, Christopher KB. Pre-hospital vitamin D concentration, mortality, and bloodstream infection in a hospitalized patient population. *Am J Med* 126(7):640.e19-27, 2013.
32. Herr C, Greulich T, Koczulla RA, Meyer S, Zakharkina T, Branscheidt M, Eschmann R, Bals R. The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer. *Respir Res* 18(12):2-9, 2011.
33. Braun AB, Gibbons FK, Litonjua AA, Giovannucci E, Christopher KB. Low serum 25-hydroxyvitamin D at critical care initiation is associated with increased mortality. *Crit Care Med* 40(1):63-72, 2012.
34. Jovanovich AJ, Ginde AA, Holmen J, Jablonski K, Allyn RL, Kendrick J, Chonchol M. Vitamin D level and risk of community-acquired pneumonia and sepsis. *Nutrients* 6(6):2196-205, 2014.
35. Kroner Jde C, Sommer A, Fabri M. Vitamin D every day to keep the infection away? *Nutrients* 29;7(6):4170-88, 2015.
36. Parekh D, Patel JM, Scott A, Lax S, Dancer RC, D'Souza V, Greenwood H, Fraser WD, Gao F, Sapey E, Perkins GD, Thickett DR. Vitamin D Deficiency in Human and Murine Sepsis. *Crit Care Med* 45(2):282-289, 2017.

37. Ginde AA, Camargo CA Jr, Shapiro NI. Vitamin D insufficiency and sepsis severity in emergency department patients with suspected infection. *Acad Emerg Med* 18(5):551-4, 2011.
38. Braun A, Chang D, Mahadevappa K, Gibbons FK, Liu Y, Giovannucci E, Christopher KB. Association of low serum 25-hydroxyvitamin D levels and mortality in the critically ill. *Crit Care Med* 39(4):671-7, 2011.
39. Leaf DE, Raed A, Donnino MW, Ginde AA, Waikar SS. Randomized controlled trial of calcitriol in severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 190(5):533-41, 2014.
40. Calton EK, Keane KN, Newsholme P, Soares MJ. The Impact of Vitamin D Levels on Inflammatory Status: A Systematic Review of Immune Cell Studies. *PLoS One* 10(11):e0141770, 2015.
41. Upala S, Sanguankeo A, Permpalung N. Significant association between vitamin D deficiency and sepsis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Anesthesiol* 4(15):84, 2015.
42. Xu S, Chen YH, Tan ZX, Xie DD, Zhang C, Zhang ZH, Wang H, Zhao H, Yu DX, Xu DX. Vitamin D3 pretreatment regulates renal inflammatory responses during lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *Sci Rep* 22(5):18687, 2015.
43. Jeng L, Yamshchikov AV, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, Tangpricha V. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med* 23(7):28, 2009.
44. Nguyen HB, Eshete B, Lau KH, Sai A, Villarin M, Baylink D. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D: an outcome prognosticator in human sepsis. *PLoS One* 8(5):643-48, 2013.

45. Leaf DE, Croy HE, Abrahams SJ, Raed A, Waikar SS. Cathelicidin antimicrobial protein, vitamin D, and risk of death in critically ill patients. *Crit Care* 10(19):80, 2015.
46. Dancer RC, Parekh D, Lax S, D'Souza V, Zheng S, Bassford CR, Park D, Bartis DG, Mahida R, Turner AM, Sapey E, Wei W, Naidu B, Stewart PM, Fraser WD, Christopher KB, Cooper MS, Gao F, Sansom DM, Martineau AR, Perkins GD, Thickett DR. Vitamin D deficiency contributes directly to the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax* 70(7):617-24, 2015.
47. Lehouck A, Mathieu C, Carremans C, Baeke F, Verhaegen J, Van Eldere J, Decallonne B, Bouillon R, Decramer M, Janssens W. High doses of vitamin D to reduce exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: a randomized trial. *Ann Intern Med* 156(2):105-14, 2012.
48. Quraishi SA, De Pascale G, Needleman JS, Nakazawa H, Kaneki M, Bajwa EK, Camargo CA Jr, Bhan I. Effect of Cholecalciferol Supplementation on Vitamin D Status and Cathelicidin Levels in Sepsis: A Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Crit Care Med* 43(9):1928-37, 2015.